



**Helena Susana  
Rodrigues Almeida  
Fonseca**

**3- Metilcrotonilglicinuria: identificação e  
caracterização molecular**





**Helena Susana  
Rodrigues Almeida  
Fonseca**

### **3- Metilcrotonilglicinuria: identificação e caracterização molecular**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Mendo, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da Doutora Laura Vilarinho, Investigadora Auxiliar do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, INSA.



Aos meus filhos, Gui, Tá e Guga.



## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Helena Silva**  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutora Luísa Cristina da Costa Azevedo**  
Investigadora do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto -IPATIMUP

**Doutora Laura Ferreira Teixeira Vilarinho**  
Investigadora Auxiliar do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães- INSA

**Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me incentivaram e apoiaram na realização deste trabalho.

À Doutora Laura Vilarinho por ter possibilitado a realização deste trabalho e pela orientação.

A Célia e Sofia gostaria de agradecer toda a disponibilidade, o espírito crítico e sugestões.

Aos meus colegas das Unidades de Rastreio Neonatal e Bioquímica Genética pelo apoio prestado.

Aos meus colegas de mestrado pela amizade, apoio e boa disposição que sempre transmitiram.

A Carmen e Rita agradeço pela compreensão, o carinho, motivação e por estarem sempre presentes.

Aos meus filhos e marido pela compreensão, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis.



## palavras-chave

3-metilcrotonilglicinúria, acidúria orgânica, *MCCA*, *MCCB*, 3-hidroxisovalérico, 3-metilcrotonilglicina, 3-hidroxisovalerilcarnitina

## resumo

O rastreio neonatal é um programa sistemático destinado a todos os recém-nascidos, tendo como objectivo evitar a evolução da patologia rastreada através do diagnóstico pré-sintomático e da instituição precoce de terapia adequada.

A 3-metilcrotonilglicinúria (MCG) é uma doença incluída no rastreio que até recentemente era considerada uma doença hereditária do metabolismo raro. Na MCG o catabolismo da leucina é bloqueado no quarto passo devido a deficiência da enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3-MCC). A 3-MCC catalisa a conversão do 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA, uma reacção reversível dependente de ATP e utilizando o bicarbonato como fonte de grupos carboxilo. O diagnóstico bioquímico da deficiência em 3-MCC é caracterizado pelo aumento marcado dos ácidos 3-hidroxisovalérico (3-HIVA) e 3-metilcrotonilglicina (3-MCG) na urina e concentrações elevadas de 3-hidroxisovalerilcarnitina (C5-OH) no sangue. A caracterização molecular reside no estudo dos genes *MCCA* e *MCCB* que codificam a enzima 3-MCC. O objectivo deste trabalho foi estabelecer um diagnóstico etiológico em doentes com MCG detectados pelo Programa Nacional de Diagnóstico Precoce e que possuíam um valor de C5-OH, marcador bioquímico primário de rastreio para esta patologia, superiores ao *cut-off* estabelecido. Numa amostra de 20 doentes pretende-se identificar e caracterizar as mutações mais frequentes na nossa população recorrendo a análise de 19 exões no gene *MCCA* e 17 exões no gene *MCCB*.

Destes casos seleccionados para estudo, foram detectadas 26 mutações das quais 16 não se encontram ainda descritas na literatura nem na base de dados *Human Gene Mutation Database*, o que corresponde a uma percentagem de novas mutações de 61.5%.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o génotipo não consegue prever o fenótipo ou o risco metabólico destes casos, mas permite confirmar o diagnóstico nos casos duvidosos. A deficiência em 3-MCC ainda não é uma patologia completamente conhecida e a sua apresentação clínica é bastante heterogénea, sendo a maioria dos doentes portadores de mutações próprias não sendo visível uma correlação genótipo – fenótipo. A continuação deste estudo é necessária para encontrar marcadores genéticos e/ou bioquímicos que expliquem a razão pela qual um número relativamente reduzido de indivíduos apresenta risco de desenvolver um fenótipo severo da doença. Verificou-se também que o estudo molecular é importante no diagnóstico de portadores sintomáticos ou assintomáticos (diagnóstico preditivo), no diagnóstico pré-natal, aconselhamento genético e com indicação para suplementação com biotina para os pacientes que tem a mutação que responde à biotina.



## keywords

3-methylcrotonylglycinuria, organic aciduria, *MCCA*, *MCCB*, 3-hydroxyisovaleric, 3-methylcrotonylglycine, 3-hydroxyisovalerylcarnitine.

## abstract

Newborn screening is a systematic program for all newborns (NB), aiming to prevent the development of the diseases traced through the diagnosis and early institution of adequate therapy.

A 3- methylcrotonylglycinuria (MCG) is a disease included in the newborn screening that until recently was considered a rare inherited disorder of the metabolism.

In the catabolism of leucine, MCG is blocked in the fourth step due to deficiency of the enzyme 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC). A 3-MCC catalyzes the conversion of 3-methylcrotonyl-CoA to 3-methylglutaconyl-CoA, a reversible reaction dependent of ATP and using bicarbonate as a source of carboxyl groups. The biochemical diagnosis of disability in 3-MCC is characterized by marked increase of acid 3-hydroxyisovaleric (3-HIVA) and 3-methylcrotonylglycine (3-MCG) in urine and high concentrations of 3-hydroxyisovalerylcarnitine (C5-OH) in the blood. The molecular characterization is the study of genes *MCCA* and *MCCB* that encodes the enzyme 3-MCC.

The aim of this study was to establish an etiologic diagnosis in patients with 3- methylcrotonylglycine detected by the Expanded Newborn Screening and that had a value of C5-OH, primary biochemical marker screening for this condition, higher than the set cut-off. In a sample of 20 patients the study intends to identify and characterize the most frequent mutations in our population using an analysis of 19 exons in the *MCCA* gene and 17 exons in the *MCCB* gene.

Of these cases selected for study, 26 mutations were detected of which 16 have not been described in the literature nor in the *Human Gene Mutation Database*, which is a percentage of new mutations of 61.5%.

The results described in this thesis shows that the genotype cannot predict the phenotype or metabolic risk of these cases, but it is capable to confirm the diagnosis in doubtful cases. The 3-MCC deficiency is a pathology not completely understood and its clinical phenotype is very heterogeneous, most patients showing different mutations making the phenotype-genotype correlation difficult. More studies are needed to find genetic and / or biochemical markers that explain why a relatively small number of individuals are at risk of developing a severe disease phenotype.

It is also important in the diagnosis of patients with symptomatic or asymptomatic (predictive diagnosis) in prenatal diagnosis, genetic counseling and provide indication for supplementation with biotin for patients who have a mutation that responds to biotin.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1. Erros inatos do metabolismo .....	4
1.2. Acidúrias Orgânicas.....	5
1.3. Catabolismo da Leucina .....	7
1.4. Metilcrotonilglicinúria .....	9
1.4.1. Apresentação Clínica .....	13
1.4.2. Caracterização bioquímica.....	14
1.4.3. Confirmação enzimática .....	15
1.4.4. Diagnóstico Molecular .....	16
1.4.5. Ciclo da Biotina (cofactor das apoenzimas) .....	16
1.4.6. A enzima 3- metilcrotonil CoA carboxilase .....	19
1.4.7. O gene <i>MCCA</i> e <i>MCCB</i> .....	22
1.4.8. Espectro mutacional do gene <i>MCCA</i> e <i>MCCB</i> .....	23
1.5. Correlação genótipo/fenótipo .....	25
1.6. Aconselhamento genético e diagnostico pré-natal .....	26
1.7. Tratamento .....	26
1.8. Objectivos.....	27
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1. Amostra seleccionada.....	31
2.2. Material biológico.....	31
2.3. Extracção de DNA .....	33
2.4. Estudo dos genes <i>MCCA</i> e <i>MCCB</i> .....	33
2.4.1. Amplificação do gDNA.....	36
2.4.2. Purificação dos produtos PCR .....	37
2.4.3. Reacção de sequenciação.....	37
2.4.4. Purificação dos produtos de sequenciação.....	37
2.4.5. Electroforese capilar .....	37
2.5. Rastreio populacional.....	38

2.6.	Análise bioinformática.....	39
2.7.	Nomenclatura das mutações e base de dados .....	40
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
3.1.	Mutações <i>missense</i> .....	44
3.1.1.	Mutações <i>missense</i> já descritas na literatura .....	46
3.1.2.	Mutações <i>missense</i> novas.....	49
3.2.	Mutações <i>nonsense</i> : .....	75
3.3.	Mutações de alteração da grelha de leitura ( <i>frameshift</i> ) - pequenas deleções ou pequenas inserções .....	77
3.3.1.	Mutações <i>frameshift</i> descritas na literatura .....	77
3.3.2.	Mutações <i>frameshift</i> não descritas na literatura .....	78
3.4.	Mutações de <i>splicing</i> .....	82
3.5.	Casos negativos .....	84
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>5.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>
7.1.	Doenças integradas no rastreio alargado em 2009 .....	103
7.2.	Preparação de amostras de sangue em papel (Guthrie cards) para análise de acilcarnitinas e aminoácidos .....	104
7.3.	Extracção de DNA a partir de sangue seco em papel de filtro (GENARATION® Capture Card Kit- Gentra Systems) .....	105
7.4.	Regras de previsão do impacto de novas variações na estrutura e função das proteínas implementadas pelo programa <i>Polyphen</i> .....	106
7.5.	Resultados obtidos .....	108



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. ....	7
Figura 2 - Diagrama representativo do metabolismo proteico nos humanos. ....	8
Figura 3 – Catabolismo da leucina. ....	8
Figura 4 – Vias metabólicas que levam a produção ou utilização da Acetil-CoA e ácido acetoacético. ....	9
Figura 5 – Representação esquemática de vias metabólicas que ocorrem na mitocôndria. ....	10
Figura 6 – Via bioquímica de formação do C5-OH e 3-MCG. ....	11
Figura 7 – Estrutura da biotina. ....	16
Figura 8 - Funções desempenhadas pelas carboxilases dependentes de biotina no metabolismo humano. ....	17
Figura 9- Ciclo da biotina. ....	18
Figura 10-Representação esquemática da subunidade $\alpha$ da 3-MCC. ....	20
Figura 11- Representação esquemática da subunidade $\beta$ da 3-MCC. ....	20
Figura 12 -Transporte de grupo carboxilo entre subunidades. ....	21
Figura 13- Espectro mutacional dos genes <i>MCCA</i> e <i>MCCB</i> . ....	24
Figura 14 – Esquema exemplificativo das alterações encontradas, relativamente ao gene, à posição no gene e domínios da enzima. ....	43
Figura 15 – Representação das mutações <i>missense</i> nos domínios da proteína (A) <i>MCCA</i> e (B) <i>MCCB</i> . ....	44
Figura 16 - Árvore genealógica do caso 4 onde foi encontrada a mutação causal. ....	47
Figura 17 - Árvore genealógica do caso 13 onde foi encontrada a mutação. ....	49
Figura 18- Mutação c.388G>A (caso 1). ....	51
Figura 19- Estrutura linear dos aminoácidos glicina (A) e serina (B), com os radicais assinalados. ....	51
Figura 20- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCA</i> . ....	52
Figura 21 – Previsão da patogenicidade da alteração c.388G>A no gene <i>MCCA</i> através do programa <i>Polyphen</i> . ....	52

Figura 22 – Árvore genealógica do caso 1 onde foi encontrada a mutação causal. ....	53
Figura 23- Estrutura linear dos aminoácidos ácido glutâmico (A) e lisina (B), com os radicais assinalados.....	53
Figura 24- Mutação c.1147G>A (caso 2).....	54
Figura 25- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCA</i> . ....	54
Figura 26 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1147G>A no gene <i>MCCA</i> através do programa <i>Polyphen</i> .....	55
Figura 27- - Mutação c.203G>T (caso 8).....	56
Figura 28- Estrutura linear dos aminoácidos glicina (A) e valina (B), com os radicais assinalados.	56
Figura 29- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	56
Figura 30 - Previsão da patogenicidade da alteração c.203G>T no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> .....	57
Figura 31 – Análise de restrição do produto de PCR do exão 3 no caso 8 com a endonuclease de restrição <i>HphI</i> . ....	58
Figura 32 - Mutação c.313G>C (caso 12).....	58
Figura 33 - Estrutura linear dos aminoácidos glicina (A) e arginina (B), com os radicais assinalados. ....	59
Figura 34- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	59
Figura 35 - Previsão da patogenicidade da alteração c.313G>C no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> .....	60
Figura 36 – Árvore genealógica do caso 12 onde foi encontrada a mutação causal. ....	60
Figura 37- Mutação c.487A>G (caso 12).....	61
Figura 38- Estrutura linear dos aminoácidos asparagina (A) e ácido aspártico (B), com os radicais assinalados.....	61
Figura 39- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	62
Figura 40 - Previsão da patogenicidade da alteração c.487A>G no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> .....	62
Figura 41 - Mutação c.599T>G (caso 19). ....	63

Figura 42 - Estrutura linear dos aminoácidos isoleucina (A) e asparagina (B), com os radicais assinalados.....	63
Figura 43 - Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	64
Figura 44 - Previsão da patogenicidade da alteração c.599T>G no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> .....	64
Figura 45- - Mutação c.688A>G (caso 6, 8 e 14). ....	65
Figura 46- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	65
Figura 47 - Previsão da patogenicidade da alteração c.688A>G no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> . ....	66
Figura 48 – Análise de restrição do produto de PCR do exão 7 no caso 6 e 14 com a enzima de restrição <i>MboII</i> . ....	66
Figura 49- Tabela frequência alélica do polimorfismo rs277995. ....	67
Figura 50 - Mutação c.1159T>G (caso 18). ....	68
Figura 51 - Estrutura linear dos aminoácidos fenilalanina (A) e valina (B), com os radicais assinalados.....	69
Figura 52- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	69
Figura 53 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1159T>G no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> . ....	70
Figura 54 - Mutação c.1229G>A (caso 9).....	70
Figura 55- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	71
Figura 56 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1229G>A no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> . ....	72
Figura 57- - Mutação c.1423G>A (caso 10). ....	73
Figura 58- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene <i>MCCB</i> . ....	74
Figura 59 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1423G>A no gene <i>MCCB</i> através do programa <i>Polyphen</i> . ....	74
Figura 60 – Árvore genealógica do caso 10 onde foi encontrada a mutação causal .....	75
Figura 61 - Mutação c.100C>T (caso 5). ....	76
Figura 62 – Representação da alteração c.100C>T nos domínios da proteína.....	76

Figura 63 - Árvore genealógica do caso 5 onde foi encontrada a mutação causal. ....	77
Figura 64 - Mutação c.97_98delT (caso 20). ....	78
Figura 65 - Representação da alteração c.97_98delT nos domínios da proteína.....	79
Figura 66 - Mutação c.924_925delAG (caso 3). ....	79
Figura 67 - Representação da alteração c.924_925delAG nos domínios da proteína. ....	80
Figura 68 - Mutação c.1635_1636insT (caso 11).....	81
Figura 69 - Representação da alteração c.1635_1636insT nos domínios da proteína.....	81
Figura 70 – Mutação c.1216 +2T>C (caso 19). ....	82
Figura 71 – Esquema representativo das várias possibilidades de efeito da mutação c.1216 +2T>C na proteína. ....	83

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Erros inatos do metabolismo mais frequentes em Portugal até Outubro de 2009 .....	4
Tabela 2- Resumo dos resultados bioquímicos dos casos seleccionados.....	32
Tabela 3 – Descrição dos <i>primers</i> desenhados para o estudo do gene <i>MCCA</i> .....	34
Tabela 4 – Descrição dos <i>primers</i> utilizados para o estudo do gene <i>MCCA</i> .....	34
Tabela 5 – Descrição dos <i>primers</i> desenhados para o estudo do gene <i>MCCB</i> .....	35
Tabela 6 – Descrição dos <i>primers</i> utilizados para o estudo do gene <i>MCCB</i> .....	36
Tabela 7 – Endonucleases de restrição utilizadas no estudo populacional .....	38
Tabela 8 - Resultados obtidos neste estudo.....	44
Tabela 9 – Descrição das mutações <i>missense</i> encontradas .....	45
Tabela 10- Descrição da mutação <i>nonsense</i> encontrada. ....	75
Tabela 11- Descrição das mutações de <i>frameshift</i> encontradas. ....	77
Tabela 12 - Descrição da mutação <i>splicing</i> encontrada. ....	82
Tabela 13 - Regras de previsão do impacto de nsSNP's na estrutura e função proteica.....	106
Tabela 14- Resultados bioquímicos e moleculares obtidos nos 20 casos estudados.....	108

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3-HIVA	3-hidroxisovalérico
3-HIVA-CoA	3- hidroxisovaleril-CoA
3-MCC	3-metilcrotonil-CoA carboxilase
3-MCG	3-metilcrotonilglicina
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGCL	Ácidos gordos de cadeia longa
ATP	Adenosina trifosfato
B-AMP	Biotinil-5-AMP
C0	Carnitina livre
C3	Propionilcarnitina
C5	Isovalerilcarnitina
C5:1	3-metilcrotonilcarnitina
C5-OH	3-hidroxisovalerilcarnitina
C6DC	3-metilglutarilcarnitina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
CoA	Coenzima A
C-terminal	Carboxilo-terminal
ddNTPs	2,3 - didesoxiribonucleótidos
DHM	Doenças hereditárias do metabolismo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleótido trifosfato
ESE	<i>Exonic sequence enhancer</i>
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
HC	Hipotireoidismo congénito
HCS	Holocarboxilase sintetase
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>

HSF	<i>Human Splicing Analyser</i>
KDa	kilo Dalton
MCD	Déficite múltiplo das carboxilases
MCG	Metilcrotoniglicinúria
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS/MS	Espectrometria de massa em <i>tandem</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMD	<i>Nonsense mediated mRNA decay</i>
N-terminal	Amino-terminal
pb	pares de bases
PC	Piruvato carboxilase
PCC	Propionil-CoA carboxilase
PCR	Reacção da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction)
PKU	Fenilcetonúria
PTC	Codão de terminação prematuro
rpm	Rotações por minuto
RFLP's	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RN	Recém nascido
RNA	Ácido ribonucleico
SMVT	Transportador multivitamínico dependente sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA

Os aminoácidos serão citados pelo código de uma letra





## Introdução

---



## 1. INTRODUÇÃO

O rastreio neonatal é um programa sistemático destinado a todos os recém-nascidos (RN), tendo como objectivo evitar a evolução da patologia rastreada através do diagnóstico pré-sintomático e da instituição precoce de terapia adequada (Vilarinho et al. 2006).

O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce em Portugal iniciou-se em 1979 com o rastreio da fenilcetonúria (PKU) e em 1981 passou também a efectuar-se o rastreio do hipotireoidismo congénito (HC). Em 2004 foi iniciado o rastreio neonatal alargado a mais doenças hereditárias do metabolismo (DHM) por espectrometria de massa *tandem* (MS/MS).

Inicialmente, o rastreio neonatal baseava-se no princípio “um método uma doença”. A introdução da tecnologia MS/MS possibilitou a transição para o princípio “um método várias doenças” (Hoffmann et al. 2004), permitindo a implementação do rastreio alargado que engloba uma grande variedade de condições herdadas detectáveis em simultâneo numa única corrida analítica (Stadler et al. 2006).

A base deste tipo de rastreio é a medição de metabolitos ou dos seus subprodutos acumulados devido ao bloqueio metabólico, após conjugação com a carnitina (Pasquali et al. 2006). Duas principais classes de metabolitos analisados pelo MS/MS são: aminoácidos e conjugados acilcarnitina.

A colheita de sangue para realizar o rastreio alargado é actualmente efectuada nos Hospitais ou Centros de Saúde, entre o terceiro e o sexto dias de vida, sendo o sangue colhido para uma ficha com papel de filtro adequado (*Whatman* 903) e posteriormente enviado para o Laboratório Nacional de Rastreios. Este rastreio é voluntário e tem actualmente uma taxa de cobertura de 99.6% com um tempo médio de início de tratamento de 11.2 dias após o nascimento (Vilarinho et al. 2006).

Actualmente 25 DHM estão incluídas no programa nacional diagnóstico precoce. O rastreio simultâneo destas DHM é efectuado pela identificação e quantificação de cerca de 3 dezenas de metabolitos marcadores destas doenças e pelas razões entre determinados metabolitos. O tempo de análise é reduzido (2-3 minutos) e a quantidade de sangue necessária é mínima devido à alta sensibilidade desta metodologia (círculo de papel de filtro com 3.2mm, o que equivale a 3,2µL de sangue total).

A 3-metilcrotonilglicinúria (MCG) é uma doença incluída no rastreio que até recentemente era considerada uma DHM rara. Com a introdução em vários centros da MS/MS no rastreio neonatal permitiu a detecção de diversas acidúrias orgânicas incluindo o défice em 3-metilcrotonil-CoA

carboxilase (3-MCC) onde parece ser a acidúria mais frequente detectada nos programas de rastreio da América do Norte (Gibson et al. 1998; Koeberl et al. 2003; Frazier et al. 2006), Europa (Baumgartner et al. 2001; Stadler et al. 2006) e Austrália (Wilcken et al. 2003) com uma frequência de aproximadamente 1 em 50.000 indivíduos. Em Portugal a 3-MCC é também a acidúria orgânica mais frequente com uma frequência de 1: 33.336 RN (Tabela 1).

**Tabela 1 – Erros inatos do metabolismo mais frequentes em Portugal até Outubro de 2009**

DHM (grupo)	Patologia	Frequência
<b>Défices da <math>\beta</math>-oxidação ácidos gordos</b>	<b>Déf. da desidrogenase dos ácidos gordos de cadeia média (MCAD)</b>	1/8.844
<b>Aminoacidopatias</b>	<b>PKU</b>	1/12.382
<b>Acidúrias Orgânicas</b>	<b>MCG</b>	1/33.336

De acordo com Han (Han et al. 2007), a introdução do rastreio neonatal alargado, baseado na tecnologia MS/MS, conduziu a um significativo decréscimo da morbilidade associada a estas doenças.

### 1.1. Erros inatos do metabolismo

Erros inatos do metabolismo são um grupo de doenças genéticas que se caracterizam pela incapacidade do organismo em converter nutrientes em outros de forma a conseguir utilizá-los em energia. Esta incapacidade pode ser devida a um défice de actividade da enzima (envolvida na síntese – anabolismo, ou na degradação – catabolismo, de uma substância); de transportadores de proteínas; ou a cofactores resultando numa acumulação anormal de metabolitos próximos do bloqueio da via metabólica. Podem ainda resultar na produção de subprodutos anormais pela conversão dos metabolitos acumulados por vias alternativas. Estes défices enzimáticos levam o organismo a acumular substâncias que se tornam tóxicas ou a reduzir a quantidade de produtos importantes para outras vias metabólicas alterando o seu funcionamento normal.

A designação “erros inato do metabolismo” surge com Archibald Garrod em 1908 num estudo sobre a doença designada por Alcaptonúria onde reconhece que a deficiência de uma enzima pode causar excessiva acumulação do seu substrato e metabolitos relacionados sendo posteriormente excretados na urina (Weatherall 2008). Archibald Garrod foi um especialista no estudo de DHM e formulou a hipótese de que os genes seriam responsáveis pela produção das enzimas descrita no clássico *Inborn Errors of Metabolism*.

As DHM são doenças individualmente raras, mas que têm uma considerável importância na saúde pública, não só devido à sua frequência conjunta, mas também devido às graves consequências para os RN, lactentes ou crianças afectadas. Se estas doenças não forem diagnosticadas e tratadas atempadamente podem provocar atraso mental irreversível (moderado a grave), atraso motor, alterações neurológicas ou, em situações mais graves, conduzir à morte.

Com a recente introdução do rastreio neonatal alargado por MS/MS, é agora possível o diagnóstico de algumas destas doenças que, desde que, detectadas precocemente, podem ser tratadas de uma forma adequada (anexo 7.1).

### **1.2. Acidúrias Orgânicas**

As acidúrias orgânicas são um grupo heterogéneo de erros inatos do metabolismo caracterizados bioquimicamente pela acumulação de ácidos orgânicos, seus ésteres e conjugados na urina e, em menor quantidade, noutros fluidos corporais. São doenças do metabolismo intermediário caracterizadas por perturbarem o equilíbrio ácido-base, e alterarem os mecanismos bioquímicos intracelulares.

Os metabolitos indicadores de acidúrias orgânicas consistem de um grupo complexo de ácidos que podem ser: alifáticos saturados e insaturados, aromáticos, hidroxilados, cetoácidos, ácidos mono-, di- e tricarboxílicos, assim como compostos heterocíclicos e conjugados, entre os quais acilglicinas e acilcarnitinas.

As acidúrias orgânicas são doenças autossómicas recessivas que resultam de um défice na actividade de uma enzima num passo específico do metabolismo dos aminoácidos. Este défice na actividade provoca a acumulação de substâncias tóxicas com o consequente dano no órgão afectado. Assim, a patofisiologia destas doenças resulta da acumulação anormal de precursores que já são por si só tóxicos ou, são metabolizados pelo organismo por vias secundárias originando a produção de compostos altamente nocivos, sendo os órgãos mais afectados cérebro, fígado, rim, pâncreas, retina, e outros.

As características clínicas destas doenças resultam da intoxicação provocada pelos metabolitos acumulados e a concomitante deficiência do produto, da importância da enzima deficiente, e da extensão do aporte de proteína ou da libertação de aminoácidos do catabolismo proteico.

A maioria das acidúrias orgânicas tem uma revelação neonatal. O RN normalmente encontra-se bem ao nascimento e nos primeiros dias de vida passam a apresentar progressivamente encefalopatia tóxica que inclui vômito, recusa alimentar, sintomas neurológicos (por exemplo convulsões, tonus muscular anormais e letargia) progredindo para coma. São portanto doenças que apresentam um intervalo livre de sintomas que é variável conforme a patologia em causa.

Estes sintomas graves podem em muitos casos conduzir à morte, e são frequentemente confundidos com septicemia, visto que ambas as situações se caracterizam por acidose e encefalopatia aguda. Nestes pacientes observa-se hipoglicemia, hiperamonemia, acidemia láctica ou cetose / cetonúria. A cetonúria nestas doenças é importante pois normalmente não ocorre em RN severamente afectados de causa não metabólica (Carmen R. Vargas 2001).

Na infância, a apresentação do quadro clínico é mais variável, sendo mais frequentes as manifestações neurológicas e, em muitas situações as únicas. Nestes pacientes, podemos ter a forma crónica progressiva ou a forma crónica intermitente. A primeira caracteriza-se por atraso desenvolvimento físico/psicomotor, recusa alimentar, vómitos, infecções de repetição, hipotonia, convulsões entre outros sinais neurológicos. A forma crónica intermitente caracteriza-se por episódios recorrentes de cetoacidose, letargia, coma e convulsões, que podem ser acompanhados de sintomas noutros órgãos, principalmente no fígado (Síndrome de Reye). O início da sintomatologia é desencadeado muitas vezes devido a infecções recorrentes, sobrecarga alimentar, após desidratação ou intervenção cirúrgica, podendo o quadro clínico de acidose metabólica ser ligeiro e mascarado por sintomas neurológicos, cardíacos, hepáticos e renais.

O diagnóstico destas doenças é efectuado pela análise de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) em amostras de urina, dando preferência a amostras colhidas durante crises de descompensação (Bonafe et al. 2000). O diagnóstico correcto depende da identificação dos metabolitos (ácidos orgânicos) característicos de determinada acidúria orgânica.

Muitas destas patologias possuem heterogeneidade nos marcadores bioquímicos e o diagnóstico é realizado muitas vezes baseado na identificação de um ou dois metabolitos principais, por vezes em baixa concentração, que são patognomónicos para a doença (Peters et al. 2008). Alguns ácidos orgânicos, em determinadas condições fisiológicas, são indetectáveis, surgindo por conseguinte da activação de vias alternativas em resposta à perda de uma determinada função enzimática. Temos o caso por exemplo, do ácido 2-metilcátrico nos défices do metabolismo propiónico (Blau et al. 2008).

No entanto, em determinadas situações clínicas diferentes de acidúrias orgânicas, pode ocorrer aumento da excreção de metabolitos relacionados com a hipoxia, jejum prolongado, dieta ou medicação.

O estudo enzimático das acidúrias orgânicas é importante para o diagnóstico da patologia e para avaliar, considerando-se a actividade residual da enzima deficiente, o prognóstico dos doentes. Este estudo realiza-se em biópsia de pele com cultura de fibroblastos. O estudo molecular é particularmente útil para confirmar o diagnóstico de algumas destas acidúrias onde o diagnóstico bioquímico ou enzimático é difícil. É o caso de indivíduos que apresentam actividade enzimática

residual e que fora de um quadro de descompensação metabólica possuem excreção normal de ácidos orgânicos.

O estudo molecular é também importante para avaliar o prognóstico em algumas acidúrias com boa correlação genótipo/fenótipo, para os estudos familiares e para o diagnóstico pré-natal.

As acidúrias orgânicas mais importantes, cujas vias de metabolismo são apresentadas na Figura 1, são as que afectam o metabolismo intermediário de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina) ou da lisina, incluindo acidúria propiônica, acidúria metilmalônica, acidúria isovalérica, acidúria MCG, acidúria 3 hidroxi 3-metilglutárica, deficiência em  $\beta$ -cetotiolase e acidúria glutárica tipo I.

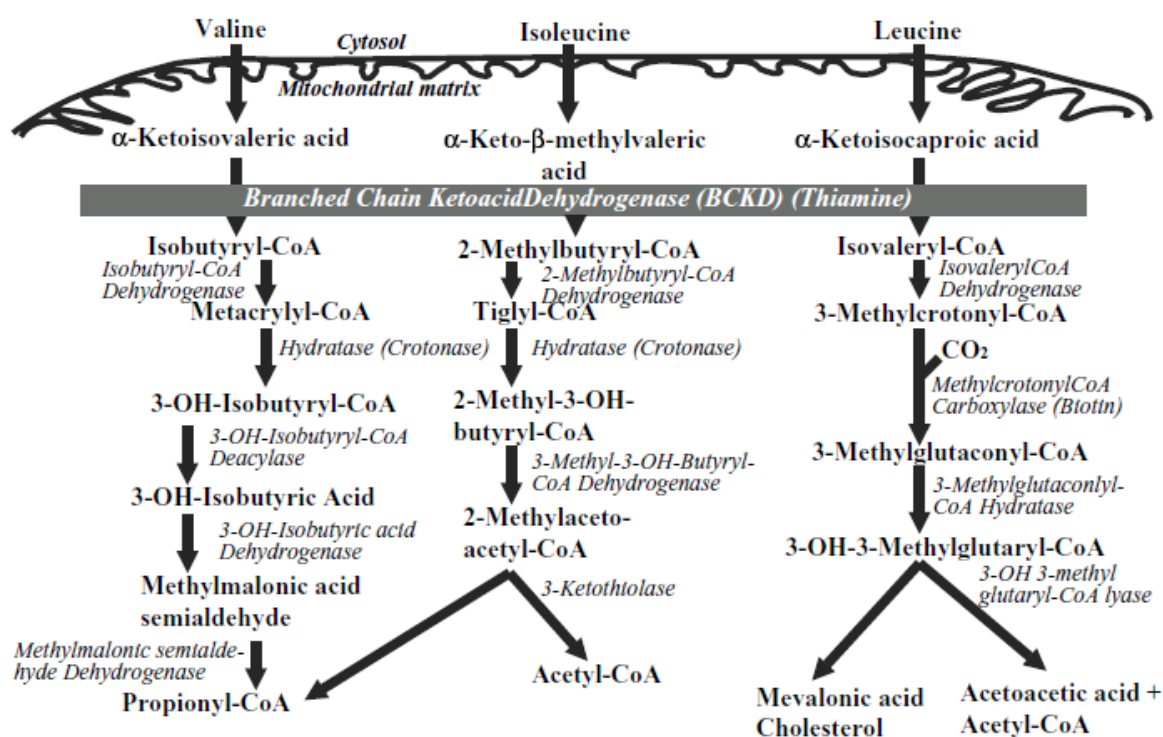
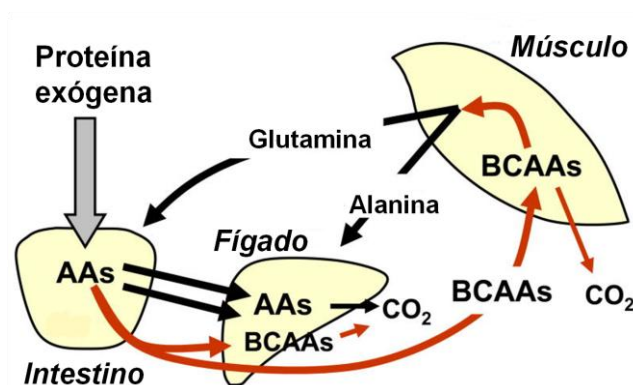


Figura 1 - Vias de catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.

(Pasquali et al. 2006)

### 1.3. Catabolismo da Leucina

Ao contrário da maioria dos aminoácidos absorvidos pelo intestino, os aminoácidos de cadeia ramificada, não são processados em grandes quantidades pelo fígado o que provoca um grande aumento na sua concentração arterial após uma refeição rica em proteínas. O músculo é o principal local onde ocorre a transaminação destes aminoácidos (Matthews 2005) (figura 2).

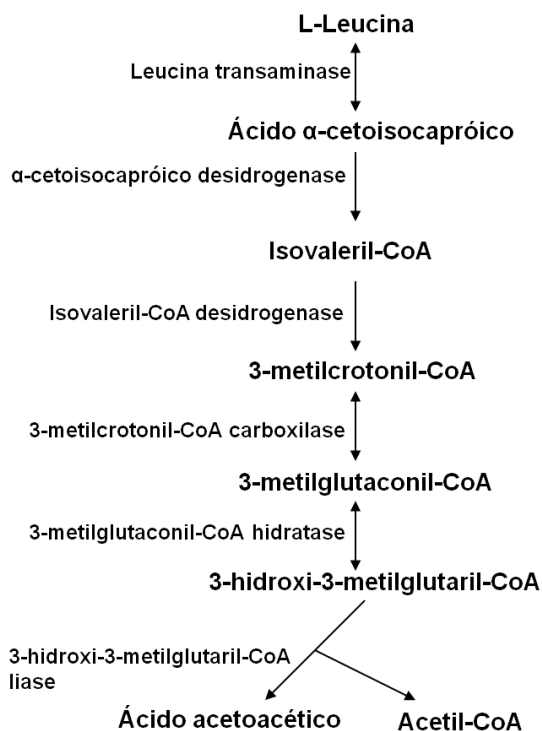


**Figura 2 - Diagrama representativo do metabolismo proteico nos humanos.**

Adaptado de Matthews, 2005.

Os cetoácidos resultantes desta transaminação podem continuar a ser metabolizados no músculo ou transportados para o fígado, rim, e coração, onde são oxidados. No fígado, o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico, o produto da transaminação da leucina, é ainda metabolizado via 3- metilcrotonil-CoA, a acetil-CoA, e a ácido acetoacético. No músculo, a leucina pode ser uma fonte de energia, através da oxidação completa em  $\text{CO}_2$  (Gallardo et al. 2001).

O catabolismo da leucina ocorre no interior da mitocôndria e conduz a formação de dois metabolitos intermediários, o ácido acetoacético e acetil-CoA (Figura 3).



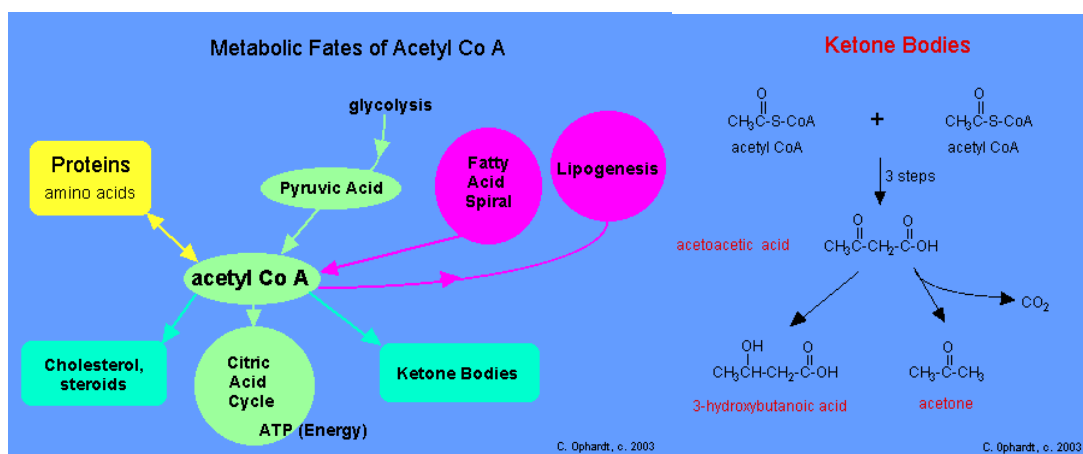
**Figura 3 – Catabolismo da leucina.**

Adaptado de Sweetman e Williams 2001.



O primeiro passo na degradação da leucina é a sua transaminação reversível no seu cetoácido correspondente ou seja, ocorre a desaminação (remoção do grupo amino) restando a cadeia carbônica na forma de  $\alpha$ -cetoácido, ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico seguida da descarboxilação irreversível pela  $\alpha$ -cetoisocapróico desidrogenase formando isovaleril-CoA. A deficiência da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos dos aminoácidos de cadeia ramificada leva à acumulação dos três aminoácidos (leucina, isoleucina e valina), devido à transaminação ser reversível, causando a Leucinose (maple syrup urine disease - MSUD).

A isovaleril-CoA é metabolizada numa série de passos para originar no final, metabolitos intermediários, ácido acetoacético e acetil-CoA, que entram no metabolismo geral (Figura 4).



**Figura 4 – Vias metabólicas que levam a produção ou utilização da Acetil-CoA e ácido acetoacético.**

(<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/623acetylCoAfate.html>)

Deficiência numa das quatro enzimas responsáveis pelo catabolismo da isovaleril-CoA resulta nas acidúrias: isovalérica (deficiência em isovaleril-CoA desidrogenase), MCG (deficiência em 3-MCC), 3-metilglutacônica (deficiência em 3-metilglutaconil-CoA hidratase), e 3-hidroxi-3-metilglutárica (deficiência 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA liase).

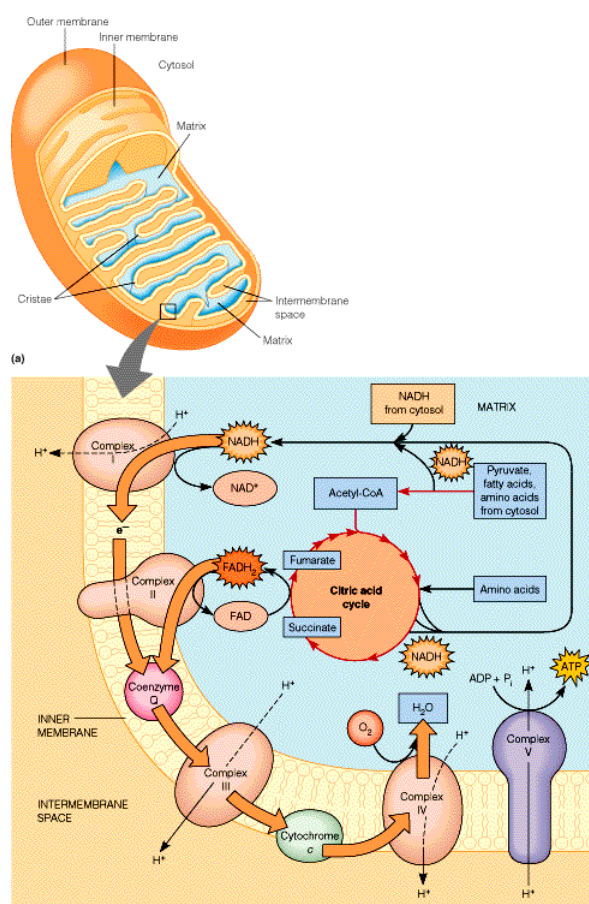
A deficiência em qualquer uma destas enzimas, e devido à desidrogenação da acil-CoA inicial ser irreversível, leva a acumulação de metabolitos próximos do bloqueio enzimático. As acil-CoA aumentadas também podem ser metabolizadas por vias secundárias produzindo outras substâncias.

#### 1.4. Metilcrotonilglicinúria

Metilcrotonilglicinúria (MIM: MCCA- 210200 e MCCB- 210210) é uma doença hereditária autossômica recessiva identificada pela primeira vez por Eldjarn (Eldjarn et al. 1970).

Na MCG o catabolismo da leucina é bloqueado no quarto passo devido à deficiência da enzima 3-MCC. A 3-MCC catalisa a conversão do 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA, uma reação reversível dependente de ATP e utilizando o bicarbonato como fonte de grupos carboxilo.

Esta enzima mitocondrial é uma de quatro carboxilases dependentes de biotina conhecida nos seres humanos, juntamente com acetil-CoA carboxilase (ACC), propionil-CoA carboxilase (PCC) e piruvato carboxilase (PC). Destas quatro enzimas apenas ACC é citosólica enquanto as outras encontram-se na matriz mitocondrial (Figura 5). Este grupo de enzimas tem funções metabólicas diversas mas possuem características estruturais semelhantes.

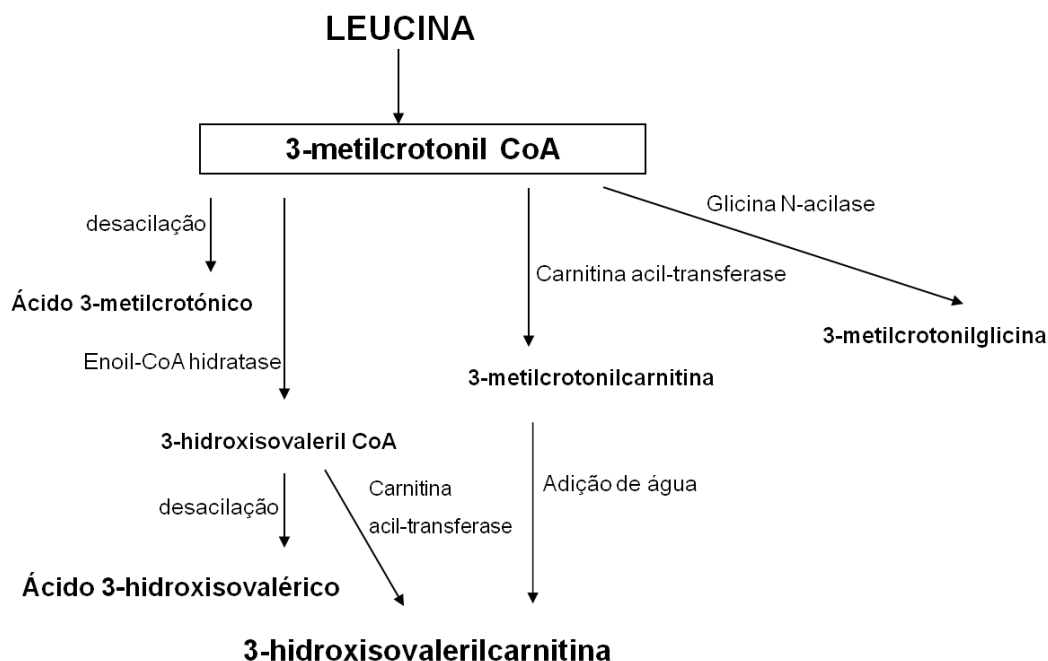


**Figura 5 – Representação esquemática de vias metabólicas que ocorrem na mitocôndria.**

(<http://www.awl.com/mathews/ch01/frames.htm>).

Devido ao déficit enzimático em 3-MCC, o 3-metilcrotonil-CoA acumula-se no interior da mitocôndria e por vias alternativas forma-se 3-metilcrotonilglicina (3-MCG) e ácido 3-hidroxiisovalérico (3-HIVA). Este último, após conjugação com carnitina, e juntamente com 3-MCG são então facilmente excretados na urina (de Kremer et al. 2002).

O 3-HIVA como já referido forma-se por uma via alternativa a partir da 3-metilcrotonil-CoA. O 3-metilcrotonil-CoA é metabolizado na matriz mitocondrial predominantemente em 3-hidroxisovaleril-CoA (3-HIVA-CoA) numa hidratação reversível catalisada por enoil-CoA hidratase (crotonase), e após desacilação forma-se 3-HIVA (Roschinger et al. 1995; Bonafe et al. 2000). 3-HIVA após conjugação com a carnitina, por acção da carnitina acil-transferase, forma o 3-hidroxisovalerilcarnitina (C5-OH). A desacilação directa da 3-metilcrotonil-CoA em ácido 3-metilcrotonico é apenas uma pequena via bioquímica (Figura 6) (Leonard et al. 1981).



**Figura 6 – Via bioquímica de formação do C5-OH e 3-MCG.**

Adaptado Roschinger 1995. A

A 3-MCG é uma acilglicina que resulta da conjugação da 3-metilcrotonil-CoA com a glicina catalisada por uma enzima mitocondrial glicina N-acilase. Esta conjugação é uma forma de eliminar produtos tóxicos de modo a evitar a acumulação de esteres de acil-CoA na mitocôndria. As acilglicinas são normalmente metabolitos residuais nos ácidos gordos, no entanto a excreção de determinadas acilglicinas é aumentada em várias DHM. Em certos casos, a medição destes metabolitos em fluidos corporais pode ser usado para diagnosticar doenças associadas com a  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. As acilglicinas urinárias reflectem a acumulação de ésteres de acil-CoA correspondente na mitocôndria (Bonafe et al. 2000). Acilglicinas são então produzidos pela acção da glicina N-acilase, que é uma enzima que catalisa a reacção química: acil-CoA mais glicina que origina CoA mais N-acilglicina. Na MCG a conjugação do 3-metilcrotonil-CoA com a glicina ocorre com grande eficiência no fígado e rim.

Nos doentes com MCG a deficiência secundária de carnitina no plasma e o razão elevada de carnitina esterificada e carnitina livre sugere uma excreção anormal de carnitina. No entanto seria de esperar que a acilcarnitina formada fosse 3-metilcrotonilcarnitina, mas de acordo com estudos realizados por Roschinger et al. (Roschinger, Millington et al. 1995) só se verifica em 2 % das acilcarnitinas urinárias totais.

A acilcarnitina que se forma é a C5-OH uma vez que no perfil de ácidos orgânicos urinários dos doentes com MCG estes apresentam níveis elevados de ácido 3-HIVA que suporta a hipótese que a carnitina forma um éster com este ácido. Por outro lado pensa-se que parte será a partir da hidratação da 3-metilcrotonilcarnitina, ou seja, a 3-metilcrotonil-CoA por acção da carnitina acetiltransferase forma a 3-metilcrotonilcarnitina que por sua vez após hidratação dá origem ao C5-OH.

A carnitina ( $\beta$ -OH- $\gamma$ -N-trimetilamino butirato) desempenha duas funções principais: o transporte de ácidos gordos de cadeia longa (AGCL) para dentro da matriz mitocondrial, para posterior  $\beta$ -oxidação e a modulação da taxa intramitocondrial de acil-CoA/Coenzima A, já que o acumulação de acil-CoA dentro da mitocôndria pode inibir muitas enzimas de ciclos vitais.

A carnitina desempenha então uma função importante no metabolismo da coenzima A (CoA), funciona como cofactor no transporte dos AGCL através da membrana interna da mitocôndria, e ajuda no transporte de grupos acil da mitocôndria ou da  $\beta$ -oxidação peroxissomal hepática para o compartimento citosólico. Uma vez que os compostos CoA são principalmente capturados pela mitocôndria, 95% no coração e 60% no fígado, onde as acilcarnitinas de cadeia curta podem mover-se livremente através das membranas subcelulares, a carnitina ajuda na excreção de acil-CoA acumulados presentes nas acidúrias orgânicas (Roschinger et al. 1995). As moléculas transesterificadas em acilcarnitinas são drenadas da mitocôndria e excretadas via rim podendo levar eventualmente a uma perda de carnitina livre.

No défice em 3-MCC a carnitina desempenha uma função similar a outras acidúrias orgânicas, actuando como uma molécula transportadora para formar o novo metabolito 3-HIVA-carnitina e ajudar a equilibrar o aumento intramitocondrial da razão acil-CoA / CoA induzida pelo bloqueio enzimático, (que é provavelmente tóxico). Esta conjugação da carnitina é importante uma vez que o organismo não é capaz de formar conjugados de glicina com 3-HIVA em quantidades significativas.

A excreção de maior quantidade do ácido 3-HIVA do que 3-MCG pode ser devida à maior actividade da crotonase em relação a glicina N-acilase e não ser devido às afinidades do substrato das duas enzimas (Sweetman L 2001).

No défice em isovaleril-CoA desidrogenase também ocorre excreção de grandes quantidades de ácido 3-HIVA mas neste caso não se forma C5-OH mas preferencialmente isovalerilcarnitina (C5).

À semelhança de outras acidúrias orgânicas, presume-se que a acumulação de compostos antes do bloqueio enzimático sejam a causa do efeito patológico primário, ou seja, a toxicidade do substrato acumulado e / ou dos compostos endógenos formados por mecanismos compensatórios. Além disso a acumulação de acil-CoA inibe o ciclo de ureia, resultando em hiperamonemia e alterando a disponibilidade de CoA livre, afectando assim o mecanismo de troca CoA-carnitina através da membrana mitocondrial e o catabolismo de outros radicais acil dos ácidos gordos e da oxidação de aminoácidos.

#### 1.4.1. Apresentação Clínica

Pacientes com deficiência em 3-MCC têm um crescimento e desenvolvimento normal até apresentarem um episódio agudo de descompensação metabólica entre os 6 meses e os 3 -5 anos de idade (Sweetman L 2001). Este episódio normalmente surge devido a uma infecção ou à introdução de uma dieta rica em proteínas.

Clinicamente esta patologia também foi identificada em adultos assintomáticos detectados em estudos familiares ou em mães cujos RN não afectados apresentam resultados positivos no rastreio neonatal (Gibson et al. 1998; Visser et al. 2000; de Kremer et al. 2002; Baykal et al. 2005; Dantas et al. 2005). Os metabolitos anormais encontrados no sangue do RN resultam da transferência através da placenta dos metabolitos secundários da mãe assintomática com défice em 3-MCC, (Arnold et al. 2008).

O fenótipo clínico e bioquímico é muito variável entre os doentes com MCG e inclui vómitos, movimentos involuntários, convulsões, recusa alimentar, apneia, letargia, coma, acompanhado com hipoglicemia severa, hiperamonemia, transaminases hepáticas elevadas e ligeira acidose metabólica e cetonúria. Publicações recentes mostram uma vasta gama de possíveis sintomas nomeadamente hipoglicemia (Oude Luttikhuis et al. 2005; Ficicioglu and Payan 2006), *stroke* metabólico (Pinto et al. 2006), dores musculares em adulto (Boneh et al. 2005), cardiomiopatia com familiares afectados assintomáticos (Visser et al. 2000) encefalopatia necrótica (Baykal et al. 2005), leucodistrofia (de Kremer et al. 2002), falência respiratória (Wiesmann et al. 1998), convulsões (Dirik et al. 2008) e atraso de desenvolvimento (Yap et al. 1998).

Roschinger et al (Stadler et al. 2006) numa revisão da literatura de estudos realizados a 37 indivíduos afectados com MCG concluiu que 27% tiveram um desenvolvimento normal e encontram-se completamente assintomáticos, aproximadamente 30% sofrem de hipotonia muscular e atraso psicomotor e quase metade sofre de diversos outros sintomas neurológicos. Foi observada

uma mortalidade de 11% causada por edema cerebral durante crise metabólica, falência respiratória, crise cardiocirculatório após ataque epiléptico prolongado ou encefalopatia disseminada.

Embora a apresentação clínica de MCG seja heterogênea e vários doentes sejam assintomáticos, todos os pacientes devem ser considerados de risco para o desenvolvimento de síndrome de Reye quando colocados em situações de stress metabólico, tais como sobrecarga de proteínas, infecções ou jejum prolongado (Pearson et al. 1995; Pasquali et al. 2006).

Por outro lado o déficit secundário de carnitina nestes doentes pode resultar em sintomatologia muscular ou mesmo cardiomiopatia (Visser et al. 2000; Boneh et al. 2005). Nos casos das mães diagnosticadas através do rastreio neonatal (Gibson et al. 1998), sem ou com sintomatologia variável, (miopatia, fraqueza, fígado gordo, fadiga), são provavelmente também devidos a deficiência secundária de carnitina.

Murayama (Murayama et al. 1997) sugere que a acumulação crónica de metabolitos anormais tais como 3-metilcrotonil-CoA e a deficiência secundária de carnitina pode contribuir para um progressivo atingimento cerebral. Uma intervenção terapêutica precoce, que passa por restrição proteica para impedir a acumulação de metabolitos anormais, e a excreção de acil-CoA por conjugação com glicina e carnitina poderia melhorar os sintomas neurológicos.

### 1.4.2. Caracterização bioquímica

O diagnóstico bioquímico da deficiência em 3-MCC é feito com base na análise urinária dos ácidos orgânicos por GC/MS e pelo perfil das acilcarnitinas sanguíneas efectuada por MS/MS.

O perfil de ácidos orgânicos é caracterizado pelo aumento marcado dos ácidos 3-HIVA e 3-MCG e o de acilcarnitinas revela concentrações elevadas de C5-OH e aumento da razão deste composto com a propionilcarnitina (C3) (Holzinger et al. 2001). A 3-metilcrotonilcarnitina (C5:1) pode estar ou não presente. É comum que estes doentes apresentem um déficit secundário de carnitina devido à sua conjugação com o 3-HIVA para posterior excreção urinária.

Existem outras patologias que no perfil de acilcarnitinas apresentam aumento de C5-OH nomeadamente: deficiência em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase, deficiência em  $\beta$ -cetotiolase, deficiência em 2-metil-3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA desidrogenase, acidúria 3-metilglutacónica, e déficit múltiplo das carboxilases (déficit holocarboxilase sintetase e deficiência em biotinidase) (Arnold et al. 2008).

Na deficiência em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase os doentes no perfil de acilcarnitinas para além do aumento de C5-OH também têm aumento de 3-metilglutarilcarnitina (C6DC) e no perfil de ácidos orgânicos possuem elevada excreção do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico.

No défice múltiplo das carboxilases (MCD), o C5OH também se encontra aumentado podendo ter associado o aumento do C3. Nesta situação o perfil de ácidos orgânicos é importante na distinção do défice em 3-MCC do MCD que pode ser causado pela deficiência em biotinidase ou holocarboxilase sintetase (HCS). Na MCD os doentes possuem a deficiência das quatro carboxilases quer devido a defeitos na inserção do cofator biotina nas apoenzimas quer na reciclagem do cofator. Nestes défices, o tratamento com biotina é eficaz. Em todas estas doenças os metabolitos anormais são 3-HIVA e 3-MCG mas no MCD outros metabolitos que são característicos da deficiência da PCC e da PC nomeadamente os ácidos láctico, 3-hidroxipropiónico e metilcítrico também se encontram elevados.

Na deficiência em biotinidade a actividade da enzima biotinidase, ao contrário da deficiência em 3-MCC, é nula. Nas outras deficiências, nomeadamente deficiência em  $\beta$ -cetotiolase, deficiência em 2-metil-3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase e na acidúria 3-metilglutacónica, o perfil de ácidos orgânicos é característico para cada uma delas com metabolitos específicos que permitem a distinção entre elas.

Em algumas situações a caracterização bioquímica não é esclarecedora, tratando-se de casos dos não excretadores que possuem um perfil de acilcarnitinas compatível com deficiência em 3-MCC mas na análise de ácidos orgânicos só possuem excreção de 3-HIVA e vestígios/ ausência de 3-MCG. A ausência ou vestígios de 3-MCG na urina aumenta a heterogeneidade bioquímica associada a deficiência em 3-MCC, uma vez que até agora níveis elevados de 3-MCG na urina tem sido considerado como marcador patognomónico da doença (Lynne A. Wolfe 2007; Dirik et al. 2008).

De acordo com estudos descritos por Holzinger (Holzinger et al. 2001) a caracterização bioquímica não permite diferenciar se os defeitos estão localizados no gene *MCCA* ou *MCCB*.

### 1.4.3. Confirmação enzimática

O diagnóstico definitivo da MCG realiza-se confirmando a deficiência isolada da actividade 3-MCC, em conjunto com actividade normal de pelo menos uma outra carboxilase em leucócitos e / ou fibroblastos para exclusão de MCD.

Koeberl (Koeberl et al. 2003) obteve resultados mais fiáveis nos estudos enzimáticos efectuados em fibroblastos. Dois pacientes que apresentavam défice parcial em 3-MCC quando estudados em linfócitos, demonstraram ter défice severo quando se realizou o estudo em fibroblastos. Este fenómeno bioquímico pode reflectir a variabilidade da expressão 3-MCC nos tecidos, e pode afectar a confirmação do diagnóstico.

A actividade 3-MCC em cultura de fibroblastos dos doentes é normalmente menos do que 2% do valor da média controlo. Não existe correlação entre actividade residual da enzima e apresentação clínica (Baumgartner et al. 2004).

Heterozigóticos para a deficiência isolada de 3-MCC não podem ser seguramente diagnosticadas pela análise enzimática em cultura de fibroblastos ou linfócitos porque a actividade da enzima se encontra normalmente dentro do intervalo normal (Rolland et al. 1991; Baumgartner 2005)

### 1.4.4. Diagnóstico Molecular

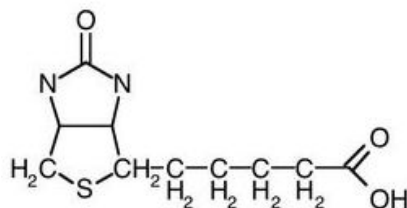
A caracterização molecular reside no estudo dos genes que codifica a enzima 3-MCC, os genes *MCCA* e *MCCB*. É uma abordagem importante pois permite confirmar o diagnóstico nos pacientes que têm perfil bioquímico compatível com a doença, ou seja, excreção de metabolitos característicos, bem como para os pacientes não excretadores dos marcadores patognomónicos da doença. É também importante no diagnóstico de portadores sintomáticos ou assintomáticos (diagnóstico preditivo), no diagnóstico pré-natal, no aconselhamento genético e na indicação para suplementação com biotina para os pacientes que tem a mutação que responde a biotina.

Neste trabalho, descrevem-se os genes *MCCA* e *MCCB*, e respectivos espectros mutacionais.

### 1.4.5. Ciclo da Biotina (cofactor das apoenzimas)

A biotina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B essencial em todos os organismos para um metabolismo e crescimento celular normal. É também conhecida como vitamina H ou B7 ou coenzima R. A biotina foi reconhecida inicialmente como uma vitamina essencial em sistemas vivos em 1936, quando foi isolada como um factor de crescimento da levedura de gema de ovo por Kogl e Tonnies (Wolf and Feldman 1982).

A estrutura da biotina foi determinada por du Vigneaud et al. em 1942 e foi sintetizada pela primeira vez 2 anos mais tarde por Harris et al. (Wolf and Feldman 1982). Biotina ( $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ ) é um anel heterocíclico anexado a uma cadeia lateral alifática que termina num grupo carboxilo (Figura 7).

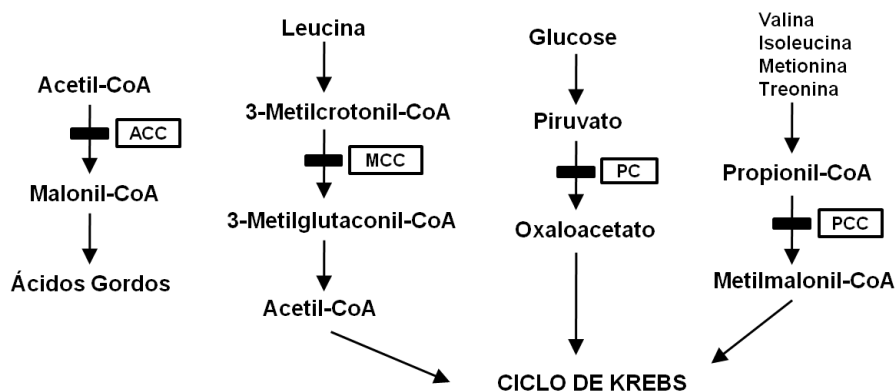


**Figura 7 – Estrutura da biotina.**

(<http://grupo10b-malonil.blogspot.com/>)



Nos humanos a biotina desempenha um papel importante em processos metabólicos como gluconeógenese, síntese de ácidos gordos e catabolismo dos aminoácidos onde actua como cofator de quatro importantes enzimas conhecidas como carboxilases dependentes de biotina ou apocarboxilases: ACC, PCC, PC e a MCC (Figura 8) (Wolf 2001; Pacheco-Alvarez et al. 2002; Rodriguez-Melendez and Zemleni 2003; Gravel and Narang 2005).



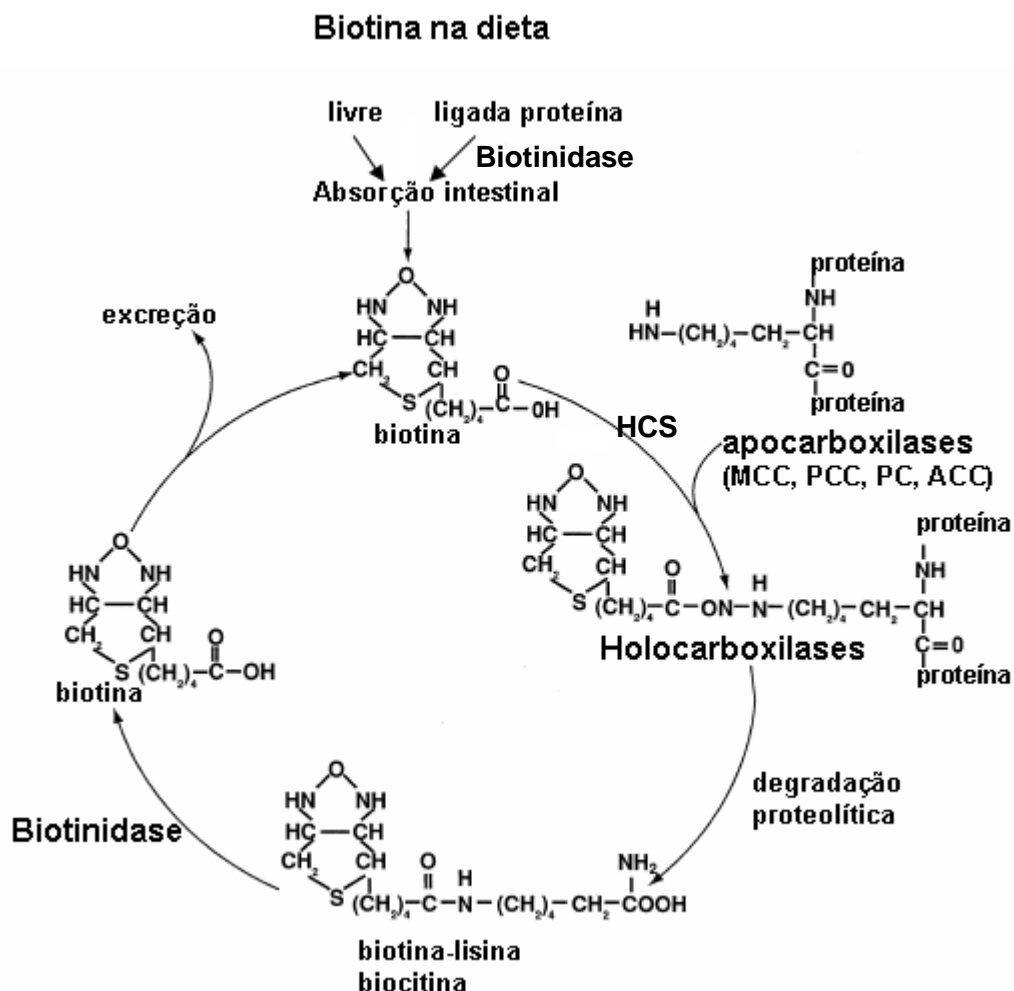
**Figura 8 - Funções desempenhadas pelas carboxilases dependentes de biotina no metabolismo humano.**

Adaptado Alvarez *et al*, 2002.

Estas enzimas usam a biotina como vector de transferência de grupos carboxilo entre moléculas dadoras e aceitadoras durante reacções de carboxilação. Biotina serve como transportador “CO<sub>2</sub>” em reacções em que o grupo carboxilo é fixado num aceitador (carboxilases), transferidos de um dador para um aceitador (transcarboxilases), ou libertado a partir de um dador como dióxido de carbono (descarboxilases). Para a biotina desempenhar a sua função necessita de se ligar às apocarboxilases, tornando-as holoenzimas activas.

Na sua evolução, os organismos eucariotas perderam a capacidade de sintetizar biotina sendo necessário satisfazer as necessidades da vitamina através da dieta, através da reutilização de biotina endógena e possivelmente através de captura de biotina geradas na flora intestinal. Na dieta a biotina está presente em baixas concentrações em relação à maioria das vitaminas hidrossolúveis e não está facilmente disponível devido à maioria estar covalentemente ligada a proteínas. Assim na dieta a biotina encontra-se presente sob duas formas, forma livre e a forma ligada a uma proteína (McMahon 2002). Na forma ligada, a vitamina associada por uma ligação covalente a um polipeptídeo através do resíduo lisina, é degradada por proteases digestivas para libertar a biotina que é posteriormente utilizada em reacções de carboxilação. Esta reacção é realizada pela biotinidase pancreática, que cliva especificamente a ligação entre a biotina e o grupo-amina do resíduo lisina.

A utilização de biotina para ligação covalente às carboxilases e a sua reutilização através da libertação da biotina das carboxilases após degradação proteolítica constitui a “ciclo da biotina” (Figura 9).



**Figura 9- Ciclo da biotina.**

Adaptado Pacheco- Alvarez et al 2002.

O ciclo da biotina é formado por três proteínas diferentes. Nos hepatócitos, a primeira proteína é o transportador multivitamínico dependente sódio (SMVT), que é responsável pelo transporte da biotina através da membrana da célula. A segunda etapa do ciclo, já no interior da célula, é catalisada por HCS, uma enzima responsável pela transformação da biotina em biotinil-5-AMP (B-AMP) e sua associação às apocarboxilases num resíduo lisina específico. A última participante no ciclo biotina é a enzima biotinidase responsável pela libertação de biotina da biocitina (biotina-lisina) ou biotinilpeptídeos derivados, quer da degradação proteolítica das holocarboxilases, quer da digestão intestinal permitindo assim a sua utilização na biotinilação de novas carboxilases. A

sequência em torno do local de ligação da biotina (resíduo lisina) nas diferentes apoenzimas é altamente conservada nas diferentes espécies (Dupuis et al. 1999).

A importância deste ciclo na manutenção de níveis de biotina dentro da célula é evidenciada pelo facto que mutações em qualquer das enzimas biotinidase ou HCS resultam em doenças do metabolismo potencialmente letais. As mutações no HCS levam à ausência na ligação da biotina as apocarboxilases (biotinilação) não ficando estas funcionais o que origina o MCD. As mutações na enzima biotinidase levam a um bloqueio, quer da libertação da biotina da alimentação, quer da reentrada da biotina no ciclo após proteólise das carboxilases para posterior reutilização, devido a não libertação da biotina da biocitina (biotina – lisina). A deficiente reciclagem da biotina resulta num défice secundário de biotina levando a uma alteração na actividade de todas as carboxilases. Estas situações são resolvidas com suplementação de biotina na dieta, uma vez que o mecanismo de absorção intestinal da biotina e a biotinilação das apocarboxilases estão inalterados. A deficiência isolada de cada uma das carboxilases tem sido associada a uma doença genética.

Tem sido sugerido que a deficiência em biotina está associada a desnutrição proteica e a sua deficiência em mulheres grávidas pode ter um efeito teratogénico (Mock 2009). Pode causar diminuição na proliferação celular, alterar a função imune, alterar a expressão de genes e conduzir a um desenvolvimento fetal anormal (Rodriguez-Melendez and Zemleni 2003). Durante a gravidez a deficiência em biotina é demonstrada pelo aumento da excreção do ácido 3-HIVA e diminuição urinária da excreção de biotina.

A função importante da biotina na regulação da expressão de genes foi estudada por Alfonso León-del-Rio (Leon-Del-Rio 2005) quando demonstrou o efeito nos níveis de mRNA das enzimas que participam no ciclo da biotina em células hepáticas humanas numa situação de deficiência em biotina. A incubação de células hepáticas num meio sem biotina resultou numa redução gradual dos níveis de mRNA que codificam a enzima HCS, carboxilases e o transportador SMVT, e mantém a expressão de genes envolvidos na utilização biotina exógena não ocorrendo nenhum efeito na expressão da biotinidase.

#### **1.4.6. A enzima 3- metilcrotonil CoA carboxilase**

3-MCC (MCC; EC 6.4.1.4) como já foi referido anteriormente é uma enzima mitocondrial dependente de biotina composta por duas heterosubunidades, uma grande subunidade  $\alpha$  contendo biotina, bem como local de ligação para dois substratos, bicarbonato e ATP, e uma subunidade  $\beta$  mais pequena que possui actividade carboxiltransferase que é essencial para a ligação a 3-metilcrotonil-CoA, com domínios funcionais altamente conservados (Stadler et al. 2005; Pasquali et al. 2006; Chu and Cheng 2007). As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam uma estequiometria de um:um

e o complexo reside numa espécie com grande massa molecular (~500-800 kDa), coerente com a ideia de que MCC é um complexo hetero-multimérico (Chu and Cheng 2007).

3-MCC possuem três domínios funcionais altamente conservados:

A) Domínio biotina carboxilase que catalisa a carboxilação da biotina dependente de ATP e usando bicarbonato como fonte de grupos carboxilo. Este domínio localiza-se na região N-terminal (aa 48-494 entre exão 3 e exão 13) da subunidade *MCCA* e possui uma sequência conservada Gli-Gli-Gli-Gli-Lis-Gli na posição 209-214 que representa o local de ligação do ATP. A *MCCA* catalisa a carboxilação da 3-metilcrotonil-CoA em 3-metilglutaconil-CoA dependente de ATP.

B) Domínio transportador biotina carboxilo que transporta o grupo prostético biotina localizado na região C-terminal (aa 629-714 entre exão 16 e exão 19) centrado no motivo Ala-Met-Lis-Met (AMKM) aminoácidos 679-683 (exão 18) da subunidade *MCCA* que corresponde ao local conservado de biotinilação (lisina biotinilada) da maioria das enzimas biotina dependentes. Um resíduo hidrofóbico a 33 aminoácidos *downstream* do resíduo lisina -fenilalanina- parece ser essencial para a biotinilação (Figura 10).



**Figura 10-Representação esquemática da subunidade  $\alpha$  da 3-MCC.**

BC – Domínio biotina carboxilase (aa 48-494); ATP – local de ligação ATP (aa 209-214); BIOTINIL – domínio transportador biotina carboxilo (aa 679-683).

C) Domínio carboxiltransferase localizado na subunidade *MCCB* catalisa a transferência do grupo carboxilo da carboxilbiotina para o substrato orgânico específico desta carboxilase 3-metilcrotonil-CoA para formar 3-metilglutaconil-CoA (Figura 11).

Este domínio nas enzimas dependentes de biotina é menos conservado do que os outros dois domínios talvez devido a diferenças no substrato.

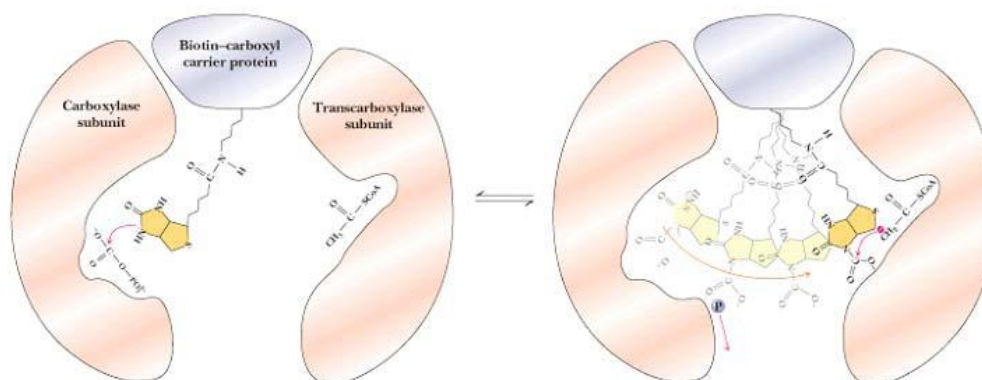


**Figura 11- Representação esquemática da subunidade  $\beta$  da 3-MCC.**

CT\_NTER - 3-metilcrotonil-CoA carboxiltransferase domínio N-terminal (aa 55-270); CT\_CTER - 3-metilcrotonil-CoA carboxiltransferase domínio C-terminal (aa 271-557), CoA – potencial local de ligação Acil-CoA (aa 343-372).

A função das enzimas dependentes de biotina é a transferência de grupos carboxilo de um substrato dador para um substrato aceitador, onde o grupo prostético de biotina actua como transportador intermediário do grupo carboxilo.

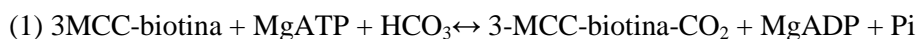
O domínio transportador biotina carboxilo tem assim uma função fundamental na transferência do grupo carboxilo activo do domínio biotina carboxilase para o domínio carboxiltransferase, seguido de transferência para 3-metilcrotonil-CoA (Figura 12).



**Figura 12 -Transporte de grupo carboxilo entre subunidades.**

<http://www.rc.unesp.br/ib/bioquimica/sintese.pdf>

Os dois tipos de subunidades diferentes que constituem a 3-MCC (*MCCA* e *MCCB*) catalisam as suas respectivas reacções numa via de duas reacções como demonstrado em (1) e (2).



Na primeira reacção ocorre a carboxilação da biotina dependente de ATP para formar a carboxilbiotina e bicarbonato que serve como fonte de  $\text{CO}_2$ . A biotina está covalentemente ligada a um resíduo lisina, motivo Ala-Met-Lis-Met, no domínio transportador biotina carboxil (biotinoil) da enzima. Na segunda reacção ocorre a transferência do grupo carboxil da biotina para 3-metilcrotonil-CoA para formar 3-metilglutaconil-CoA. Esta reacção é catalisada pela carboxiltransferase (Sloane and Waldrop 2004). O grupo prostético biotina é posicionado no fim de uma longa cadeia polipeptídica facilitando a translocação do  $\text{CO}_2$  entre o domínio biotina carboxilase e o domínio carboxiltransferase. Ambas as subunidades *MCCA* e *MCCB* são sintetizadas no retículo.

Estas subunidades possuem sequências de aminoácidos específicas que possibilitam o seu envio directamente para uma localização própria. Uma proteína que tem como destino atravessar as duas membranas mitocondrias normalmente possui uma sequência *targeting* na região N-terminal e esta sequência é reconhecida por receptores presentes na membrana mitocondrial.

Os terminais amino de ambas as subunidades *MCCA* e *MCCB* de humanos são ricos em hidroxilados e em aminoácidos básicos característicos dos sinais *targeting* mitocondriais. Ambas são transportadas para a matriz mitocondrial dependente de potencial de membrana e apenas na presença deste potencial de membrana estas subunidades são reduzidas no tamanho através de pré-sequências *targeting* de clivagem reconhecidas por proteases mitocondriais. O sítio de clivagem no precursor *MCCA* é entre tirosina 41 (Tyr-41) e treonina 42 (Thr-42) originando peptídeo maduro com uma massa molecular de 80 kDa. No precursor *MCCB* o local de clivagem é entre alanina 22 (Ala-22) e tirosina 23 (Tyr-23) resultando *MCCB* maduro com uma massa molecular de 61.8 kDa

Stadler et al (Stadler et al. 2005) demonstraram que os sinais *targeting* mitocondriais do *MCCA* estão localizados 39 aminoácidos após o resíduo de iniciação metionina dentro da região amino-terminal, e que esta região é necessária e suficiente para dirigir *MCCA* para a mitocôndria. Conseguiram demonstrar quando originaram uma proteína truncada com apenas 34 aminoácidos nesta região (1-34) ou quando à proteína era retirado a região amino terminal (39-725) estas apresentavam um sinal citoplasmático. O mesmo acontece com *MCCB* em que os sinais *targeting* mitocondriais se localizam 1-20 na região amino terminal e variantes desta proteína com esta região mais curta (1-13 ou 21-563) resulta numa proteína com sinais citoplasmáticos.

Pensa-se que os genes que codificam as carboxilases dependentes de biotina possuem um ancestral comum porque embora tenham variações na arquitectura catalisam reacções muito semelhantes. O ancestral comum revela-se quando se compara a sequência de aminoácidos destas proteínas. Todas estas enzimas possuem uma grande homologia no local de biotinilação MET-LIS-MET localizado 35 aminoácidos do C-terminal excepto ACC que se localiza no N-terminal da proteína. Todas as carboxilases possuem o motivo PRO-XN-PRO 30-35 aminoácidos do lado amino terminal do local de ligação da biotina. Para além destas sequências todas as carboxilases dependentes de biotina têm vários resíduos conservados de valina e glicina em determinadas posições específicas em relação ao local de biotinilação (Pacheco-Alvarez et al. 2002). Qualquer mutação nestas sequências compromete a biotinilação das apocarboxilases.

### 1.4.7. O gene *MCCA* e *MCCB*

O gene estrutural do *MCCA* está localizado no cromossoma 3q26-q28 e abrange cerca de 70 kb do DNA genómico e consiste em 19 exões (Obata et al. 2001). O cDNA correspondente (MCCC1

GenBank: AF310972), é extenso com 2580 pb e uma *Open Reading Frame* de 138 a 2315 pb que codifica uma proteína de 725 aminoácidos (subunidade  $\alpha$ ) com massa molecular de aproximadamente de 80 kDa (Holzinger et al. 2001).

O gene *MCCB* está localizado nos humanos no cromossoma 5q13 e consiste em 17 exões. O cDNA correspondente é longo (MCCC2 GenBank: AF310971), 2304 pb, com uma *Open Reading Frame* de 100 a 1791 que codifica uma proteína de 563 aminoácidos (subunidade  $\beta$ ) com peso molecular aproximadamente de 61,8 kDa (Baumgartner et al. 2001; Gallardo et al. 2001; Holzinger et al. 2001).

As duas subunidades codificadas por genes diferentes não possuem sequências similares entre elas mas são bastantes conservadas entre humanos e plantas (Holzinger et al. 2001).

Os mRNAs *MCCA* e *MCCB* expressam-se em órgãos ricos em mitocôndrias, tecidos com rápido crescimento e metabolicamente activos, tais como coração, músculo-esquelético, rim e fígado.

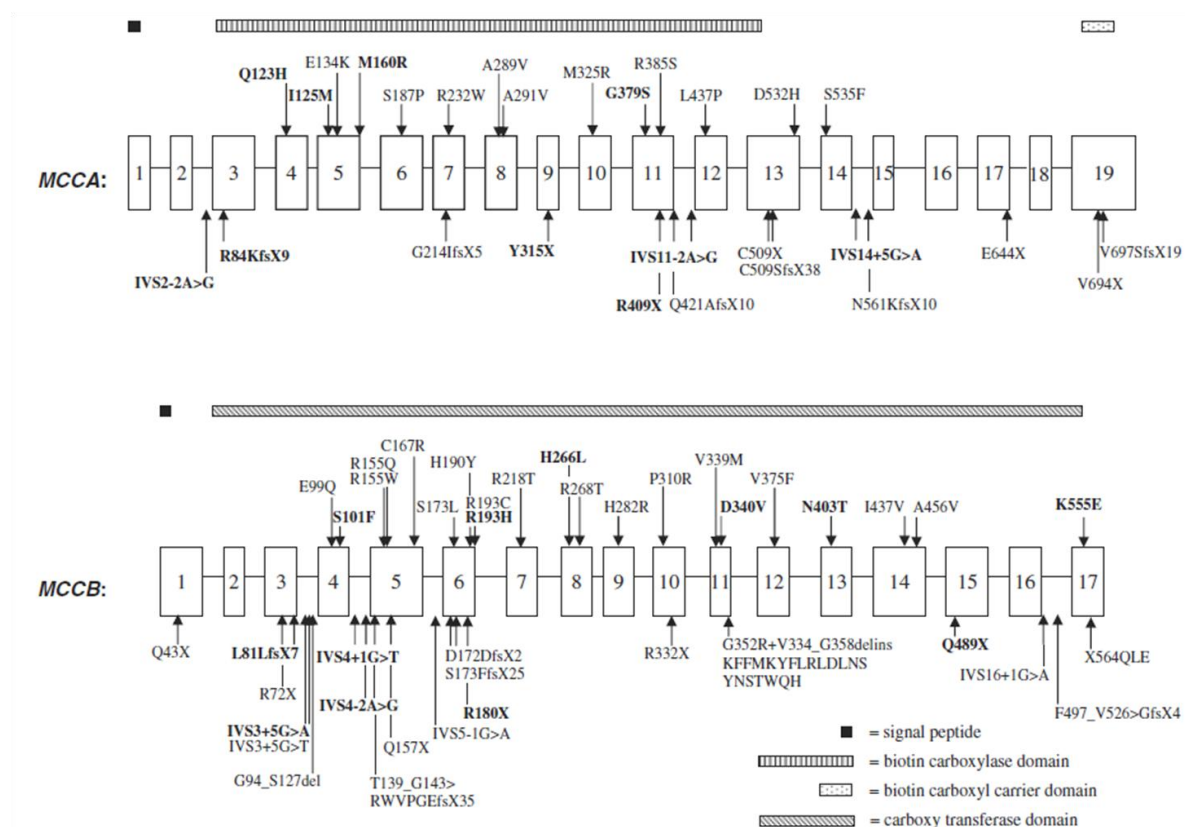
Além disso, estes dois mRNAs existem coordenadamente numa razão molar aproximadamente igual, cada um representa entre 0,01 e 0,1 mol% do mRNA celular (McKean et al. 2000; Chu and Cheng 2007).

Murin et al (Murin et al. 2006) desenvolveram uma investigação para avaliar a capacidade de células neurogliais degradarem a leucina na presença de 3-MCC nas células do cérebro de rato. Neste estudo demonstraram uma localização mitocondrial do 3-MCC em todos os tipos de células neuroglial investigados, o que veio reforçar o que já tinha sido descrito anteriormente sobre a localização da enzima 3-MCC nos astrócitos e neurónios (Bixel and Hamprecht 2000). A expressão MCC em células neurogliais demonstra a capacidade das células para utilizar a leucina como fonte de energia satisfazendo pelo menos uma parte das suas necessidades energéticas. O existência da 3-MCC entre células gliais e neuronais, em várias partes do sistema nervoso deve indicar onde a leucina pode ser utilizada para a produção de energia (Bixel and Hamprecht 2000; Murin et al. 2006). Estas células contribuem assim para a oxidação de leucina no cérebro.

#### **1.4.8. Espectro mutacional do gene *MCCA* e *MCCB***

Os indivíduos afectados com deficiência em 3-MCC possuem duas mutações no gene *MCCA* ou *MCCB*. As mutações identificadas são extremamente heterogéneas e quase equitativamente distribuídas ao longo do dois genes, *MCCA* e *MCCB*, sem *hotspot* mutacional (Figura 13) (Stadler et al. 2006).

Actualmente na base de dados *Human Gene Mutation Database* (HGMD) do locus *MCCA* e *MCCB*, estão descritas 81 mutações diferentes sendo a maioria mutações *missense* tanto nos genes *MCCA* como *MCCB*, juntamente com mutações *splicing* e pequenas inserções / deleções (Desviat et al. 2003).



**Figura 13- Espectro mutacional dos genes *MCCA* e *MCCB*.**

A representação esquemática da estrutura genômica mostra o número e tamanho aproximado de todas as regiões codificantes dos genes *MCCA* e *MCCB*. A localização dos domínios, domínio biotina carboxilase, domínio transportador biotina carboxilo, domínio carboxiltransferase e os sinais *targeting* mitocondriais também são mostrados nos genes *MCCA* e *MCCB* (Stadler et al. 2006).

Recentemente alguns estudos foram publicados contribuindo para o conhecimento do espectro mutacional desta patologia.

Uematsu (Uematsu et al. 2007) identificou 9 novas mutações nos genes *MCCA* e *MCCB*. No gene *MCCA* encontrou uma mutação *missense* no exão13 p.I460M, uma mutação *nonsense* no exão 16 p.Q584X e uma deleção no exão 9 p.K301AfsX10. No gene *MCCB* encontrou 2 mutações *missense* p.H190R no exão 6, p.D280Y no exão 9, uma *nonsense* p.Q198X no exão 6, uma deleção no exão11 p.G352RfsX26 e duas inserções p.L543VfsX11 no exão 17, p.A218V no exão 7.



Dirik (Dirik et al. 2008) identificou uma troca do aminoácido serina pela fenilalanina na posição 39 (p.S39F) no exão 1 do gene *MCCB*. Esta nova mutação foi identificada num paciente que apresentava apenas excreção de 3-HIVA no perfil de ácidos orgânicos e estudos enzimáticos revelaram actividade residual da enzima (7.2% da média controlo).

Eminoglu num artigo publicado recentemente (Eminoglu et al. 2009) identificou uma grande deleção de 2264 pb (c.873+4524\_6787de12264) no gene *MCCA*. Até a data foi a primeira grande deleção identificada no défice em 3-MCC.

### 1.5. Correlação genótipo/fenótipo

Com base nos estudos anteriores não parece existir nenhuma correlação genótipo-fenótipo (Baumgartner et al. 2001; Gallardo et al. 2001; Holzinger et al. 2001; Dantas et al. 2005; Stadler et al. 2006). Não há mutações exclusivamente associadas a casos sintomáticos ou assintomáticos, não existindo portanto mutações específicas que possam ser relacionadas com fenótipos clínicos suaves ou severos.

Mesmo em situações de ausência de uma das subunidades da enzima em conjugação com perda completa da sua actividade não origina necessariamente manifestações clínicas (Holzinger et al. 2001). Por outro lado, em situações em que a enzima possui actividade residual que poderia levar a um fenótipo suave pode pelo contrário originar manifestações clínicas severas como foi demonstrado por Baumgartner (Baumgartner et al. 2001).

Stadler et al. no seu estudo realizado em 2006 comparou indivíduos com fenótipo severo nomeadamente que levaram à morte com indivíduos assintomáticos e verificou que a mesma mutação foi encontrada num indivíduo com fenótipo severo bem como num indivíduo assintomático. Por conseguinte, o genótipo não parece ajudar a predizer o fenótipo ou resultado clínico dos indivíduos detectados no rastreio neonatal com deficiência em 3-MCC.

Por outro lado existe uma escassez de dados sobre as correlações entre o grau de elevação do metabólito e o diagnóstico ou os riscos metabólicos (Arnold et al. 2008).

Dados clínicos, bioquímicos e genéticos apoiam fortemente a ideia de que outros factores além do genótipo em locus MCC devem ter uma grande influência sobre o fenótipo da deficiência em 3-MCC. Tais factores adicionais que podem influenciar o fenótipo da deficiência em MCC incluem genes modificadores e, talvez o mais importante, a extensão em que a via metabólica fica afectada quer por dieta rica em proteínas, quer por outros factores ambientais tais como infecções (Lynne A. Wolfe 2007).

### 1.6. Aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal pode-se realizar através da determinação da actividade da enzima 3-MCC em biópsia de vilosidades coriônicas ou amniócitos cultivados e / ou quantificando o ácido 3-HIVA no líquido amniótico. Em famílias com genótipo conhecido do caso índice é possível oferecer diagnóstico pré-natal por análise de mutações.

Na opinião de Baumgartner, dada a ampla gama fenotípica e do número crescente de pacientes assintomáticos, e mesmo de irmãos assintomáticos de pacientes sintomáticos afectados, o diagnóstico pré-natal é apenas justificado em irmãos de pacientes com início neonatal severo.

### 1.7. Tratamento

Em situações de crises agudas de acidose metabólica, o tratamento da acidúria 3-MCG passa pela administração de fluidos e electrólitos para corrigir a acidose. Uma dieta com restrição protéica ou com baixo teor de leucina é geralmente recomendada (Sweetman L 2001). O aporte calórico adequado de carboidratos e a diminuição dos períodos de jejum com aumento do número de refeições contribuem para evitar o catabolismo proteico e a cetógenese.

Nestes pacientes a suplementação com carnitina oral (75-100 mg/Kg por dia) é importante devido aos défices secundários de carnitina livre que estes doentes normalmente apresentam e também para aumentar a excreção de ácido 3-HIVA. Estes défices de carnitina podem levar, em crianças com défice em 3-MCC, a desenvolver cardiomiopatia ou até morte (Arnold et al. 2008).

Para aumentar a desintoxicação de 3-metilcrotonil-CoA, os doentes são tratados com glicina uma vez que faz aumentar a excreção de 3-MCG.

O tratamento com biotina tem sido descrito como não tendo nenhum efeito clínico e nem alterando a excreção dos ácidos 3-HIVA e 3-MCG. Friebe (Friebe et al. 2006) descreve o primeiro paciente com défice em 3-MCC, deficiência esta causada por uma mutação em heterozigotia, que demonstra uma significativa e sustentada resposta clínica e bioquímica a doses terapêuticas de biotina. A resposta a doses biotina neste paciente é consistente com a observação de que a mutação R385S-MCCA produz uma proteína estável.

O tratamento deve ser sempre ponderado mesmo em crianças, detectadas através do programa rastreio neonatal, que se apresentam clinicamente bem mas com um risco de descompensação metabólica durante um episódio de stress metabólico (dieta rica em proteínas e infecções) se não forem tomadas precauções e tratamento específico durante a doença (Ficicioglu and Payan 2006). Para um desenvolvimento normal e para reduzir o número de descompensações metabólicas o tratamento com carnitina e com restrição de leucina parece ser suficiente (Sweetman L 2001).

## 1.8. Objectivos

No trabalho que se apresenta o objectivo principal foi estabelecer um diagnóstico etiológico em doentes com MCG detectados pelo Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Numa amostra de 20 doentes pretende-se identificar e caracterizar as mutações mais frequentes na nossa população recorrendo à análise de 19 exões no gene *MCCA* e 17 exões no gene *MCCB*.

O estabelecimento do diagnóstico etiológico é importante uma vez que se trata de uma doença hereditária com transmissão autossómica recessiva passível de aconselhamento genético.

Por forma a alcançar este objectivo foi necessário proceder à implementação do estudo molecular desta patologia, não disponível em Portugal até ao momento.



## Material e Métodos

---



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo descreve o processo de selecção da amostra, os materiais e métodos utilizados, assim como os equipamentos, os processos e ferramentas informáticas usados na análise de dados.

### 2.1. Amostra seleccionada

O estudo baseou-se numa população de 433.367 RN que realizaram o rastreio neonatal alargado correspondendo a 99,8 % dos RN, nascidos em Portugal continental e ilhas, entre Março de 2005 e Outubro de 2009.

Para efeitos do estudo, foi efectuada a selecção de uma amostra através da análise do perfil de acilcarnitinas por MS/MS. A metodologia usada em todo o processo desde a preparação da amostra biológica à sua análise encontra-se descrita em anexo (anexo 7.2). Esta metodologia foi adaptada da descrita por Rashed (Rashed et al. 1995).

Assim, foi seleccionada uma amostra de 13 RN por possuírem valores de C5OH, marcador bioquímico primário de rastreio para esta patologia, superiores ao *cut-off* estabelecido (valores superiores a 1  $\mu\text{mol/L}$ ) o que é sugestivo de MCG. Nestes indivíduos foi previamente excluída a hipótese de se tratar de outra doença metabólica<sup>1</sup> através de diagnóstico bioquímico específico (análise dos ácidos orgânicos urinários efectuado pela Unidade Bioquímica Genética do Centro de Genética Médica - INSA) (Tabela 2).

Foram também estudadas 6 mães assintomáticas que foram detectadas através do estudo do sangue dos seus filhos no rastreio neonatal. Estas mães tinham um aumento de C5OH no perfil de acilcarnitinas. Em alguns casos foram efectuados estudos familiares.

Foi também estudada uma criança sintomática do sexo masculino de origem espanhola de 3 anos de idade com atraso desenvolvimento e com perfil acilcarnitinas compatível com MCG.

### 2.2. Material biológico

Para a realização do estudo molecular utilizou-se sangue seco colhido em papel de filtro *Whatman 903*, como material biológico – fichas do rastreio neonatal.

---

<sup>1</sup> acidúria 3-hidroxi 3-metilglutárica, défice múltiplo das carboxilases, deficiência em biotinidase, 3-metilglutacónica ou acetoacetyl-CoA tiolase mitocondrial ( $\beta$ -cetotiolase)

**Tabela 2- Resumo dos resultados bioquímicos dos casos seleccionados**

Caso	C0 (μmol/L)	C5-OH (μmol/L)	Confirmação bioquímica
1	26.6	4.0	3-MCG e 3-HIVA
2	20.6	1.5	3-MCG e 3-HIVA
3	29.2	1.3	n.d.
4	77.4	2.3	n.d
5	16.9	14	3-MCG e 3-HIVA
6	26.5	4.2	n.d
7	15.6	1.9	3-HIVA
8	27.2	1.0	3-HIVA
9	8.45	13.2	n.d
10	16.1	4.0	3-HIVA
11	54.1	2.4	3-HIVA
12 ●	n.d	n.d	3-MCG e 3-HIVA
13 ●	28.9	5.5	3-HIVA
14 ●	31.0	3.0	n.d
15 ●	12.6	1.0	3-HIVA
16 ●	13.9	1.2	n.d
17 ∇	23.0	3.7	3-HIVA
18	35.0	2.8	3-HIVA
19 ●	23.5	2.9	n.d
20	38.6	1.7	3-HIVA

C0-carnitina livre; C5-OH-isovalericarnitina; n.d.- não disponível

Valor de referência do C0 (9,13-68,45 μmol/L) e C5-OH (0-0,57 μmol/L) para RN até um mês.

Valor de referência do C0 (19,24-48,48 μmol/L) e C5-OH (0,13-0,52 μmol/L) mais de 1 ano

∇ - valores de C0 e C5-OH com tratamento

● - casos maternos



### 2.3. Extracção de DNA

Na extracção de DNA utilizam-se substâncias desproteinizantes, capazes de desnaturar e retirar as proteínas que estão acopladas ao DNA; a adição posterior de isopropanol faz com que o material genético precipite sendo posteriormente solubilizado em tampão apropriado para subsequente uso na reacção de PCR.

O DNA genómico das amostras seleccionadas, familiares e de 100 indivíduos controlo foram obtidos a partir do sangue seco em papel de filtro extraído com o kit GENERATION® *Capture Card Kit- Gentra Systems*.

Resumidamente, este procedimento consiste nos seguintes passos: o DNA é purificado da amostra cortando um disco de 3mm; lavagem com solução de purificação de DNA e, em seguida, precipitação com isopropanol. Durante a purificação o DNA permanece ligado ao papel de filtro, enquanto as proteínas e outros contaminantes são selectivamente removidos e após o passo secagem, a amostra está pronta para a amplificação do DNA.

O procedimento referente a este método encontra-se detalhado em anexo (Anexo 7.3).

### 2.4. Estudo dos genes *MCCA* e *MCCB*

Na abordagem de sequenciação do DNA genómico, a amplificação dos exões e junção exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, foi efectuada utilizando *primers* específicos descritos por Holzinger (Holzinger et al. 2001) com ligeiras alterações, outros foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3 v.0.4.0* e *FastPCR*® (Tabela 3, 4, 5 e 6).

A estes *primers* foi adicionada uma sequência de 18 nucleotídeos (M13F e M13R) que permitem a utilização de um *primer* universal para todos os fragmentos na realização do PCR de sequenciação. O *primer* M13F possui a sequência TGTAACACGACGGCCAGT, enquanto o *primer* M13R apresenta a sequência CAGGAAACAGCTATGACC (direcções 5'-3').

Antes de se proceder ao estudo dos doentes foram efectuados gradientes de 8 temperaturas, de 55° a 65°, para todos os exões em DNA controlo, de forma a optimizar as condições de PCR e assim obter uma melhor amplificação.

**Tabela 3 – Descrição dos *primers* desenhados para o estudo do gene *MCCA***

Região	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Sequência do <i>primer</i> (5' -> 3')
Exão 6/7	622	65	F TGTAACACGACGGCCAGTTTGTCTCTCAGACTCGATG
			R CAGGAACAGCTATGACCCACAGGACAGAACTGGGAAA
Exão 19	273	65	F TGTAACACGACGGCCAGTGGTCTCCCTTTCTTGACTTGG
			R CAGGAACAGCTATGACCGGCACTTCCTCTTTTGGTG

pb – Pares de bases

°C- graus centígrados

**Tabela 4 – Descrição dos *primers* utilizados para o estudo do gene *MCCA*. (Holzinger et al. 2001).**

Região	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Sequência do <i>primer</i> (5' -> 3')
Exão 1	184	65	F TGTAACACGACGGCCAGTCGAGCTGCCTCTGTACTGG
			R CAGGAACAGCTATGACCCCTGTCTCCGCCTCTGCC
Exão 2	169	65	F TGTAACACGACGGCCAGTCTTTGAAAGAACAAATGTGTTGCC
			R CAGGAACAGCTATGACCCCTAAACACTTCCAGTCTGAAGC
Exão 3	253	65	F TGTAACACGACGGCCAGTCTATTCTATTCTTTGCTCTCC
			R CAGGAACAGCTATGACCCGTACACAGTAAACGAATAAACG
Exão 4	214	56.9	F TGTAACACGACGGCCAGTGTATAGTGTATGAGTATGACT
			R CAGGAACAGCTATGACCCATCAGTTGCACAAAACGTAT
Exão 5	244	56.9	F TGTAACACGACGGCCAGTGCATTAAGGTGTTGCCAGTT
			R CAGGAACAGCTATGACCGCCAACTATTCAACTGA
Exão 8	248	56.9	F TGTAACACGACGGCCAGTGTGCTAACAGTTTAGCTTA
			R CAGGAACAGCTATGACCCAGAGTAAGATTACATTAC
Exão 9	184	65	F TGTAACACGACGGCCAGTCTAGTAAGGCAAGCTACTAATGG
			R CAGGAACAGCTATGACCCATAAATTAACACTGTTACGTC
Exão 10	221	56.9	F TGTAACACGACGGCCAGTCTGATTATACACTATTGAATATGACC
			R CAGGAACAGCTATGACCCACCGCACCCAGCCAAGGC
Exão 11	281	65	F TGTAACACGACGGCCAGTGTAGCCGCTATACGGTAGATTTC
			R CAGGAACAGCTATGACCGTACTAAAACTTAAAAAGAGTGAGC
Exão 12	206	65	F TGTAACACGACGGCCAGTCTTCTGTGTTTGACTTGAAGAGG
			R CAGGAACAGCTATGACCGGTGCTGACCAACACATCAAGG
Exão 13	308	65	F TGTAACACGACGGCCAGTTATTGTTTTCCCACTCAGCAGG
			R CAGGAACAGCTATGACCTGCAAACTTGACAAGCAGAGG
Exão 14	210	56.9	F TGTAACACGACGGCCAGTTGTAAGGTGTAATTTTCATAGGC
			R CAGGAACAGCTATGACCGATTAATGTGATACATTCTATG

<b>Exão 15</b>	189	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT	GAGAGTGAGATTCTTTATATCTCGG
			R	CAGGAAACAGCTATGACC	GTATAAAAGCGGTCAGATTACAGC
<b>Exão 16</b>	256	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT	GATCTTATTAATTCTGTAGTG
			R	CAGGAAACAGCTATGACC	GTCAAACAGTTTTCTCCCATGC
<b>Exão 17</b>	244	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT	GGTATATTAGTAAAAATATAGTGATAGG
			R	CAGGAAACAGCTATGACC	TAAATGACAAGTTTAACAAAGCCACG
<b>Exão 18</b>	187	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT	GCAGATGAACATATCTAGGACC
			R	CAGGAAACAGCTATGACC	GGTATGATTGCTCCCAAAGTCC

pb – Pares de bases

°C- graus centígrados

Tabela 5 – Descrição dos *primers* desenhados para o estudo do gene *MCCB*

Região	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de annealing (°C)	Sequência do <i>primer</i> (5' -> 3')	
<b>Exão 1</b>	474	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT GCTGAGGCTCTGTCCCTTATT
			R	CAGGAAACAGCTATGACC CGTGCCTCACAGAATCAACT
<b>Exão 2</b>	322	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT AGGCAGGGGTGAATCTTTT
			R	CAGGAAACAGCTATGACC AAAGCAATAACTATTTTAGGAC
<b>Exão 9/10</b>	500	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT TGAGAGAAGATACTTGGGACCTG
			R	CAGGAAACAGCTATGACC CCACATCTATTTCTAGGCATGAAC
<b>Exão 11</b>	282	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT GCATGTCAAATGAAATTCTAGTG
			R	CAGGAAACAGCTATGACC CCTGATTTTCAAAGCAGCAG
<b>Exão 14</b>	391	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT TCTTAAGGCGAGAGGCATTT
			R	CAGGAAACAGCTATGACC TTGATTGAGATCTGGGAATGG
<b>Exão 15</b>	252	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT AACATGGGCCTCTGAAAATC
			R	CAGGAAACAGCTATGACC CTCCTGGCTCCAGGGTGT
<b>Exão 17</b>	221	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT TAGTTTGGTGGTAAATTCATAACTC
			R	CAGGAAACAGCTATGACC GGCTACTACATGTGTTAATTTTCAG

pb – Pares de bases

°C- graus centígrados

Tabela 6 – Descrição dos *primers* utilizados para o estudo do gene *MCCB*. (Holzinger et al. 2001).

Região	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')	
Exão 3	188	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT GAGACCTTTTATCGTGCAATCTAA
			R	CAGGAAACAGCTATGACCGTACTATGGAACAGAGAACTC
Exão 4	237	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT CATGTGTAACGTGTTAAATGTGTAG
			R	CAGGAAACAGCTATGACCGGATGCCTGTGCCTCATCAAAGTC
Exão 5	282	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT TTGGGGTATCTTGTAATGAGTG
			R	CAGGAAACAGCTATGACCATACATACAGCCTCCAAACTATC
Exão 6	244	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT GTAGCACATTTAGTTCATAGAG
			R	CAGGAAACAGCTATGACAGCCATCCAGAGTACCTAATTCTG
Exão 7	312	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT GCATCTCATGTGTTGTCTGTGTGC
			R	CAGGAAACAGCTATGACCTACTAAACGTCACCAAGCTGTAC
Exão 8	219	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT TGTCTGATGGACCGATTCTACTG
			R	CAGGAAACAGCTATGACCTGGTGTGGTCTGGCAAGTTTAGC
Exão 12	236	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT GAAAAGCACAAAGACATAAACTCTTC
			R	CAGGAAACAGCTATGACCGTTGCTGAGGCATCTAGTTAAGC
Exão 13	182	56.9	F	TGTA AACGACG GCCAGT TAGAATGCATGATGATAATAGAG
			R	CAGGAAACAGCTATGACCGGTACAGCTCTGGAATCAATAC
Exão 16	220	65	F	TGTA AACGACG GCCAGT AGTTGTTCACTGAAGCTGACTTAC
			R	CAGGAAACAGCTATGACCGCACATCTCAACTACATAGAGC

pb – Pares de bases

°C- graus centígrados

#### 2.4.1. Amplificação do gDNA

A amplificação dos exões foi efectuada utilizando uma mix, *ImmoMix™ Red* (Bioline-Biocompare®). A 6,25 µl desta mix (que inclui *IMMOLASE Taq DNA Polymerase*, tampão de reacção, dNTPs e cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>)), adicionou-se 0,125 µl de *primers* (F/R) (100pmol) correspondentes a cada exão ou fragmento a amplificar, 1 – 2,5 µl gDNA alvo e água bidestilada para um volume final de 12,5 µl. Submeteu-se a mistura final ao seguinte ciclo de temperaturas: uma desnaturação inicial/ activação da polimerase de 10 minutos a 96°C, seguida de 35 ciclos de 60 segundos a; 95° C desnaturação, 56,9°C – 65°C de temperatura de *annealing*, extensão a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos de 72°C, no termociclador *Thermal Cycler* (BioRad).

A verificação da amplificação por PCR foi efectuada por electroforese num gel de agarose 2%/TAE (*Invitrogen*) (m/v), onde se adiciona 3 µl de *SybrGreen* (*Roche*) e se aplica 5 µl de cada amostra. O *SybrGreen* é um corante fluorescente altamente sensível para detecção de cadeias de DNA e oligonucleotídeo em géis de agarose e poliacrilamida.

As amostras correm numa tina de electroforese a 125 volts durante 15 minutos. O princípio da electroforese utilizada para separação de DNA baseia-se na carga negativa do DNA dada pelos átomos de oxigénio dos grupos fosfato. No final do processo, as cadeias de DNA estão próximas ao pólo positivo. Moléculas de menor peso molecular terão mais facilidade de migrar pelo gel do que as de maior peso molecular, e percorrerão uma distância maior ficando mais próximas do pólo positivo. A visualização das bandas de amplificação é possível devido ao corante usado, *Sybrgreen*, que intercala as cadeias de DNA emitindo fluorescência quando excitado por luz ultravioleta num transiluminador, permitindo assim visualização das bandas.

#### 2.4.2. Purificação dos produtos PCR

Os produtos de PCR foram purificados pelo método enzimático utilizando o kit *Exosap-IT*®, de forma a eliminar os *primers* não incorporados e/ou amplificações inespecíficas. Para tal, adicionou-se 2 µl de *ExoSap-IT*® a cada 5 µl de produto PCR, e incubou-se no termociclador a 37°C durante 30 minutos, temperatura óptima para a actividade da enzima, seguida de uma incubação a 80°C durante 15 minutos, para inactivação da enzima.

#### 2.4.3. Reacção de sequenciação

Para a reacção de sequenciação, utilizou-se 2 µl *Big Dye*® *Terminator v1.1 Cycle Sequencing Mix* (que contém MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos e *AmpliTaQ DNA polimerase*), 0,5 µl de *primer M13* (F ou R) a 3,2 pmol/µl e 2,5 µl de produto PCR purificado.

O programa incluiu uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 25 ciclos de 10 segundos a 94°C, 6 segundos a 50°C e 4 segundos a 60°C, no termociclador *Thermal Cycler* (BioRad).

#### 2.4.4. Purificação dos produtos de sequenciação

Os produtos de sequenciação foram purificados utilizando colunas contendo 750µl de *Shephadex G-50* (*Amersham Biosciences*), de forma a eliminar os dNTPs e ddNTPs não incorporados e sais que pudessem interferir com a electroforese capilar. Centrifugam-se a 4400 rpm durante 4 minutos.

#### 2.4.5. Electroforese capilar

Aos produtos purificados foram adicionados 15 µl de formamida desionizada (formamida *Hi-Di*™ *Applied Biosystems*), que é uma substância desnaturante e de elevada viscosidade, agitam-se no vortex e deixam-se dissolver durante 10 minutos.

A separação dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático *ABI3130xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems) de 16 capilares de 36 cm. Este tipo de sequenciação baseia-se no método desenvolvido por *Sanger et al.* (Sanger et al. 1977) e recorre a nucleótidos terminadores da cadeia que são didesoxinucleótidos trifosfatados marcados com um fluorocromo na extremidade 3' (ddNTP). O sequenciador detecta a fluorescência dos 4 didesoxinucleótidos, através dos diferentes comprimentos de onda de luz emitida por radiação da amostra.

## 2.5. Rastreio populacional

Foi efectuado o rastreio populacional a duas mutações das não descritas que suscitaram dúvidas de serem causadoras da doença. A ocorrência de uma mutação pontual pode originar a criação ou abolição de um local de restrição e essa característica pode ser usada para o estudo de mutações. A técnica utilizada neste estudo foi RFLP's (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) que se baseia na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior separação, por electroforese, dos fragmentos gerados, que correspondem a padrões de restrição específicos. Esta técnica foi aplicada ao caso em estudo (controlo positivo) e a 100 controlos. Foi possível a análise de restrição às mutações novas detectadas: no exão 7 em que cria um local de corte para a enzima *MboII* (Fermentas) e no exão 3 em que elimina um local de corte para a enzima *HphI* (*New England Biolabs*) (Tabela 7). O método consiste na extracção de DNA de 100 indivíduos controlo e do caso index e posterior amplificação e verificação do fragmento de DNA de interesse pelo método já descrito 2.4. e 2.5.1., seguida da digestão de 8 µl de produto PCR com 2 µl de uma endonuclease de restrição específica para a sequência alvo, e posterior incubação 3 horas no banho a 37°C.

**Tabela 7 – Endonucleases de restrição utilizadas no estudo populacional**

Região	Tamanho do fragmento	Endonuclease de restrição	Tamanho dos fragmentos digeridos	
			Normal	Mutado
Exão 3	227pb	<i>HphI</i> (GGTGA)(N)8	91pb+136pb	227pb
Exão 7	306pb	<i>MboII</i> (GAAGA)(N)8	306pb	106pb+200pb

Os diferentes fragmentos resultantes da digestão são posteriormente separados por electroforese em gel de agarose a 3% /TAE, onde se aplicam 10 µl de cada amostra. As amostras correm numa tina de electroforese a 80 volts durante 1 hora. Comparou-se as amostras com um produto PCR não

digerido (NC), controlo positivo e a 5 µl do marcador de peso molecular *50 Base-Pair Ladder* (GE Healthcare) a fim de se calcular aproximadamente o tamanho dos fragmentos digeridos.

## 2.6. Análise bioinformática

O desenho de *primers* específicos para a amplificação dos vários exões de cada gene foi efectuado no programa *Primer3* (<http://primer3.sourceforge.net/>).

*FastPCR* (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/>) foi outro software utilizado que permite verificar a qualidade dos *primers*, no que diz respeito à temperatura de *melting*, formação de estruturas secundárias e formação de dímeros de *primers*.

Para a previsão das alterações pontuais encontradas e ainda não descritas recorreu-se ao programa *Polyphen* (Polymorphism Phenotyping) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). Este programa é uma ferramenta que prevê o possível impacto de uma substituição de um aminoácido na estrutura e função da proteína humana utilizando simples considerações físicas e comparativas. Esta previsão é baseada em regras empíricas directas que são aplicadas à sequência e à informação estrutural e filogenética que caracterizam a substituição (Anexo-7.4). A previsão é efectuada pela análise de *scores* entre o aminoácido normal e o aminoácido alterado sendo posteriormente calculado o valor da diferença entre as *scores* de ambas as variantes alélicas na posição polimórfica. Esta diferença pode variar entre zero, que corresponde a uma variação sem efeitos fenotípicos (variação benigna), e um valor superior a dois que corresponde a uma variação rara ou pouco observado na família da proteína (variação provavelmente patogénica).

As sequências aminoacídicas utilizadas para efectuar o alinhamento fazem parte da base de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) e o alinhamento das sequências seleccionadas foi realizado no programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Este programa realiza alinhamentos com outras espécies previamente definidas e através de um algoritmo de alinhamento progressivo, baseado na similaridade das sequências, alinha as sequências de aminoácidos. Com o alinhamento é possível identificar motivos com elevado grau de conservação e permite observar a conservação da zona mutada, sendo possível concluir que quanto maior o grau de conservação maior é a probabilidade de a alteração ser patogénica.

Para pesquisar as enzimas de restrição específicas de determinada sequência foi utilizado o programa *Nebcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Esta ferramenta permite seleccionar as enzimas de restrição comercialmente disponíveis que cortam uma determinada sequência de nucleotídeos.

Para a previsão das alterações de *splicing* recorreu-se ao programa *Human Splicing Analyser* (HSF) (<http://www.umd.be/HSF/>) que é uma ferramenta que prevê os efeitos das mutações nos sinais de *splicing* ou identifica os locais de *splicing* em qualquer sequência humana (Desmet et al. 2009).

### 2.7. Nomenclatura das mutações e base de dados

As variações de sequência detectadas foram descritas de acordo com as recomendações de nomenclatura de mutações da *Human Gene Variation Society* (HGVS) (den Dunnen and Antonarakis 2001).

Foi utilizada a sequência de referência de cDNA para os genes *MCCA* e *MCCB* descrita no *RefSeq* NCBI: NM\_020166.3 e NM\_022132.4. Foram também utilizadas as sequências proteicas RefSeq NCBI: NP\_064551.3 e NP\_071415.1 dos genes *MCCA* e *MCCB* respectivamente.

Na pesquisa de variações já descritas foi consultada a literatura e a base de dados HGMD®-*Human Gene Mutation Database* profissional, disponível na página <http://www.biobase-international.com/>.



## Resultados e Discussão

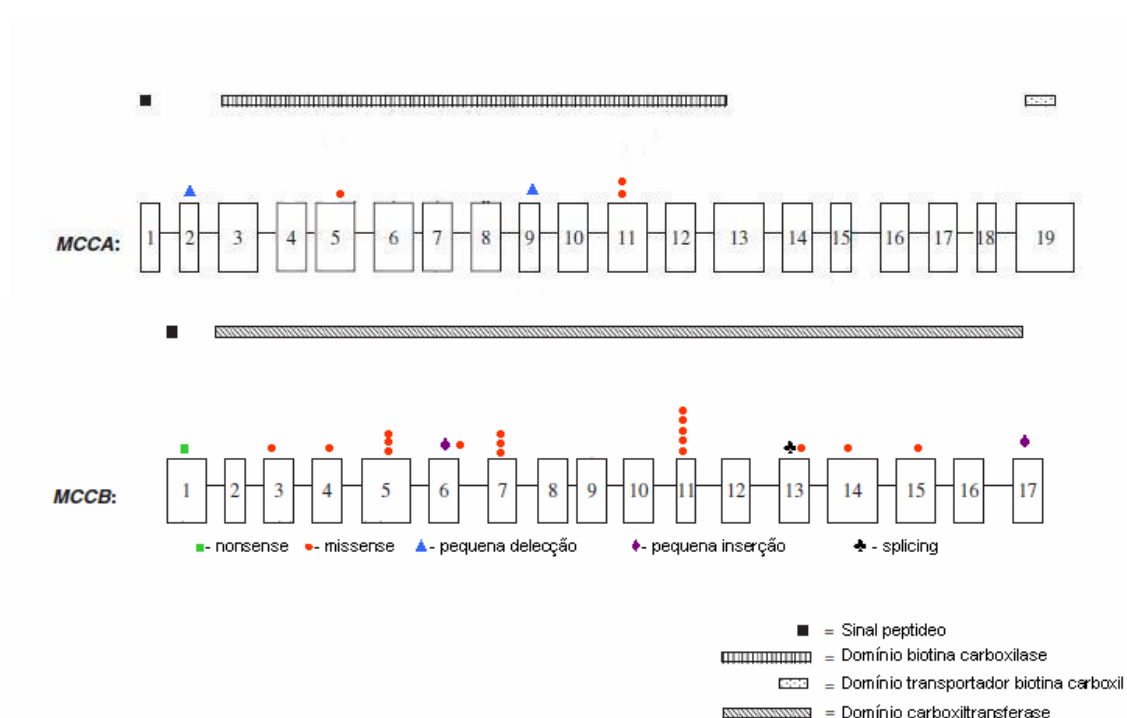
---



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos 20 casos seleccionados para estudo, foram detectadas 26 mutações que se distribuem da seguinte forma: 1 mutação *nonsense*, 4 mutações *frameshift* (pequenas deleções e pequenas inserções), 20 mutações *missense* e 1 mutação de *splicing*. Das mutações detectadas, 16 não se encontram ainda descritas na literatura nem na base de dados *HGMD*®, o que corresponde a uma percentagem de novas mutações de 61.5%.

Estes resultados estão esquematizados na Figura 14. Verificou-se recorrência de 3 mutações nos casos seleccionados, sendo que uma delas ainda não se encontra descrita na literatura.



**Figura 14 – Esquema exemplificativo das alterações encontradas, relativamente ao gene, à posição no gene e domínios da enzima.**

Pela análise da Figura 14, verifica-se que foram detectadas predominantemente mutações *missense* localizadas ao longo de todo o gene *MCCA* e *MCCB*, correspondendo aos domínios biotina carboxilase na subunidade *MCCA* e ao domínio carboxiltransferase da subunidade *MCCB* sem nenhum *hotspot* mutacional. As mutações foram maioritariamente encontradas no gene *MCCB* (21 das 26 mutações) o que é consistente com os resultados obtidos por Dantas (Dantas et al. 2005). Dos 20 casos estudados, 4 são homozigóticos, 8 são heterozigóticos compostos, 5 em que apenas foi detectada uma mutação em heterozigotia, 1 com uma mutação em heterozigotia com efeito dominante e 2 em que não foram encontradas nenhuma alteração. Na Tabela 8 estão referidos todos

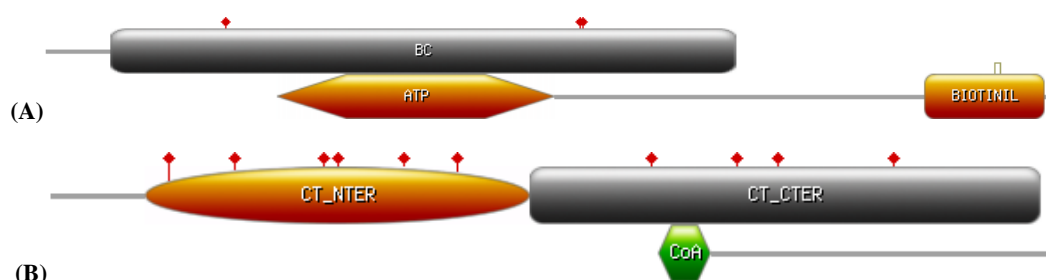
os resultados moleculares obtidos neste estudo. No anexo 7.5 são apresentados os resultados bioquímicos e moleculares de todos os casos estudados.

**Tabela 8 - Resultados obtidos neste estudo**

Caso	Gene	Exão	Alteração em cDNA	Efeito na proteína	Referência
1	MCCA	5	c.388G>A/c.388G>A	p.G130S/p.G130S	Não descrita
2	MCCA	11	c.1147G>A/N	p.E383K/N	Não descrita
3	MCCA	9	c.924_25delAG/N	p.Arg308_309SerfsX2/N	Não descrita
4	MCCA	11	c.1155A>C/N	p.R385S/N	Gallardo et al. (2001)
5	MCCB	1	c.100 C>T/c.100 C>T	p.Q34X/p.Q34X	Não descrita
6	MCCB	7	c.688A>G/N	p.N230D/N	Não descrita
7	MCCB	5; 11	c.463C>T/c.1015G>A	p.R155W/p.V339M	Dantas et al. (2005); Baumgartner et al. (2001)
8	MCCB	3; 7	c.203G>T/c.688A>G	p.G68V/p.N230D	Não descritas
9	MCCB	14	c.1229G>A/c.1229G>A	p.G410D/p.G410D	Não descrita
10	MCCB	5; 15	c.463C>T/c.1423G>A	p.R155W/p.G475R	Dantas et al. (2005); Não descrita
11	MCCB	11; 17	c.1015G>A/c.1635_36insT	p.V339M/p.Ser546X	Baumgartner et al. (2001); Não descrita
12	MCCB	4; 5	c.313G>C/c.487A>G	p.G105R/p. N163D	Não descritas
13	MCCB	11	c.1015G>A/N	p.V339M/N	Baumgartner et al. (2001)
14	MCCB	7	c.688A>G/c.688A>G	p.N230D/p.N230D	Não descrita
17	MCCB	6; 11	c.517_518insT/c.1015G>A	p.S173FfsX25/p.V339M	Gallardo et al. (2001); Baumgartner et al. (2001)
18	MCCB	11; 13	c.1015G>A/c.1159T>G	p.V339M/p.F387V	Baumgartner et al. (2001); Não descrita
19	MCCB	6; 13	c.599T>G/c.1216 +2T>C	p.I200N/IVS 13+2T>C	Não descritas
20	MCCA	2	c.97_98delT/N	p.V33GfsX6/N	Não descrita

### 3.1. Mutações *missense*

Como referido anteriormente a maioria das mutações *missense* ocorre no gene *MCCB*. Este facto é visível na Figura 15.



**Figura 15 – Representação das mutações *missense* nos domínios da proteína (A) *MCCA* e (B) *MCCB***

A Tabela 9 resume os resultados obtidos relativamente às mutações *missense* encontradas em ambos os genes. Cada uma delas é seguidamente discutida pormenorizadamente.

**Tabela 9 – Descrição das mutações *missense* encontradas**

Caso	Gene	Exão	Alteração cDNA	Efeito na proteína	Referência
1	<i>MCCA</i>	5	c.388G>A/c.388G>A	p.G130S + p.G130S	Não descrita
2	<i>MCCA</i>	11	c.1147G>A/N	p.E383K/N	Não descrita
4	<i>MCCA</i>	11	c.1155A>C/N	p.R385S/N	(Gallardo et al. 2001)
6	<i>MCCB</i>	7	c.688A>G/N	p.N230D/N	Não descrita
7	<i>MCCB</i>	5/11	c.463C>T/c.1015G>A	p.R155W/p.V339M	(Baumgartner et al. 2001; Dantas et al. 2005)
8	<i>MCCB</i>	3/7	c.203G>T/c.688A>G	p.G68V/p.N230D	Não descritas
9	<i>MCCB</i>	14	c.1229G>A/c.1229G>A	p.G410D/p.G410D	Não descrita
10	<i>MCCB</i>	5/15	c.463C>T/c.1423G>A	p.R155W/p.G475R	(Dantas et al. 2005; Não descrita)
11	<i>MCCB</i>	11	c.1015G>A	p.V339M	(Baumgartner et al. 2001)
12	<i>MCCB</i>	4/5	c.313G>C/c.487A>G	p.G105R/p.N163D	Não descritas
13	<i>MCCB</i>	11	c.1015G>A	p.V339M	(Baumgartner et al. 2001)
14	<i>MCCB</i>	7	c.688A>G/c.688A>G	p.N230D/p.N230D	Não descrita
17	<i>MCCB</i>	11	c.1015G>A	p.V339M	(Baumgartner et al. 2001)
18	<i>MCCB</i>	11/13	c.1015G>A/c.1159T>G	p.V339M/p.F387V	(Baumgartner et al. 2001); Não descrita)
19	<i>MCCB</i>	6	c.599T>G	p.I200N	Não descrita

### 3.1.1. Mutações *missense* já descritas na literatura

Três das mutações *missense* encontradas neste trabalho já se encontram descritas na literatura. Uma foi identificada no caso 4 no exão 11 do gene *MCCA*, a transversão nucleotídica c.1155A>C (Gallardo et al. 2001) que origina substituição de um resíduo de arginina por um de serina no codão 385 (p.R385S), outra no exão 5 do gene *MCCB*, nos casos 7 e 10 a transição nucleotídica c.463C>T (Baumgartner et al. 2001) que origina substituição de um resíduo de arginina por um de triptofano no codão 155 (p.R155W) e por fim a transição nucleotídica c.1015G>A (Dantas et al. 2005) no exão 11 do gene *MCCB* nos casos 7, 11, 13, 17 e 18 que origina substituição de um resíduo de valina por um metionina no codão 339 (p.V339M).

#### Mutação c.1155A>C

Esta mutação foi encontrada em heterozigotia no caso 4 no gene *MCCA* e embora tenham sido sequenciados todos os exões e junções exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB* a partir de DNA genómico nenhuma outra alteração foi identificada.

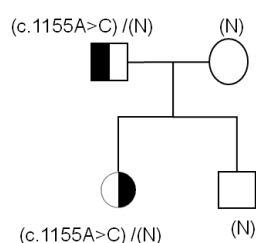
A arginina na posição 385 é altamente conservada em mamíferos, plantas, fungos e bactérias e corresponde a um resíduo no domínio biotina carboxilase que se tem revelado como fazendo parte de uma “bolsa” carregada positivamente importante para ligação do bicarbonato (Sloane and Waldrop 2004). O produto proteico do alelo dominante negativo é funcionalmente inactivo e tem a propriedade de inibir a actividade do produto proteico do alelo normal. Devido a este efeito dominante negativo os indivíduos que são heterozigóticos para esta mutação apresentam alterações clínicas e bioquímicas.

Sloane et al. mostraram que uma mutação *missense* correspondente a *MCCA*-R385S, a mutação R338S, no domínio biotina carboxilase da *E. coli*, exibiu um efeito dominante negativo no funcionamento do local activo do alelo normal, pela cooperação negativa no que diz respeito à concentração de bicarbonato. Por outro lado, conseguiram demonstrar que o grau de cooperação negativa diminuiu com concentrações crescentes de biotina. Estes dados confirmam a hipótese de um efeito dominante negativo da R385S *MCCA* sobre a proteína do tipo selvagem e, portanto, na actividade enzimática MCC, ou seja a proteína mutada interfere com o funcionamento da proteína normal produzida pelo alelo normal no heterozigótico.

Estudos de expressão mostram claramente que a mutação R385S origina uma enzima cataliticamente inactiva mas estável, possibilitando a formação do complexo proteico, e a substituição de um resíduo de arginina por uma serina destabiliza a “bolsa” carregada positivamente necessária para a ligação do bicarbonato, reduzindo assim a ligação do substrato e

provocando perda de função da enzima (Baumgartner et al. 2001; Desviat et al. 2003). Esta mutação parece ser a mais frequente em pacientes com 3-MCG de origem alemã (Baumgartner 2005).

Friebel num artigo publicado em 2006 (Friebel et al. 2006) fala-nos no primeiro doente com deficiência em 3-MCC com esta mutação em heterozigotia, no qual demonstrou resposta clínica e bioquímica à biotina. A resposta à biotina neste doente é consistente com a observação que R385S produz uma proteína estável e está de acordo com Sloane e Waldrop (2004) que demonstraram que a biotina neutraliza o efeito dominante negativo. Foram estudados os pais e o irmão deste doente, tendo sido encontrada a mesma mutação no pai em heterozigotia sendo a mãe e o irmão normais para esta mutação (Figura 16).



**Figura 16 - Árvore genealógica do caso 4 onde foi encontrada a mutação causal**

À semelhança do caso estudado, o pai também apresenta um fenótipo bioquímico correspondente a uma deficiência em 3-MCC tendo no entanto atingido a idade adulta assintomático. Uma das possibilidades para o comportamento assintomático demonstrado pelo pai, é o menor fluxo metabólico nesta via, o que está consistente com identificação de adultos assintomáticos com 3-MCC encontrados por Gibson (Gibson et al. 1998). Existem no entanto outros factores nomeadamente o tipo de alimentação e a ocorrência de infecções. Outra possível explicação é a quantidade de *MCCA* funcional que o alelo normal produz contribuindo para uma variação do fenótipo nos heterozigóticos para esta mutação. Um heterozigótico com baixa expressão do alelo normal pode ser clinicamente e bioquimicamente sintomático, por outro lado se a expressão do alelo normal estiver aumentada o indivíduo é assintomático (Baumgartner 2005).

Existe também a possibilidade de genes modificadores, tais como *MCCB* e *HCS*, terem a capacidade de alterar a função da 3-MCC ou fluxo da via metabólica, podendo desta forma atenuar ou potenciar o fenótipo da doença (Baumgartner 2005).

### Mutação c.463C>T

Esta mutação foi encontrada em dois casos heterozigóticos compostos, no caso 7 e 10, no gene *MCCB*. Ambos os casos tiveram aumento de C5-OH no perfil de acilcarnitinas mas na cromatografia de ácidos orgânicos urinários apenas tinham excreção aumentada de 3-HIVA mas sem excreção de 3-MCG. Esta mutação não foi descrita como associada aos não excretadores do marcador patognomónico. No caso 7 existe uma mutação noutra alelo já descrita como associado aos não excretadores, por a enzima possuir actividade residual. No caso 10 embora também exista uma mutação noutra alelo esta não se encontra descrita mas provavelmente deve possuir alguma actividade enzimática.

Esta mutação foi descrita pela primeira vez por Dantas et al. em 2005 (Dantas et al. 2005), onde demonstrou que esta mutação se localiza numa zona bastante conservada. Num estudo populacional realizado em 100 cromossomas não foi encontrada nenhum caso, o que permite concluir que esta mutação tem uma baixa frequência na população. Esta alteração resulta numa actividade nula 3-MCC. Esta conclusão foi baseada noutros estudos realizados por Baumgartner (Baumgartner et al. 2001) onde se demonstrou que a expressão da mutação c.464G> A (R155Q) resulta numa actividade indetectável de 3-MCC. Uma vez que a troca é de uma arginina por triptofano na mesma posição é muito provável que esta mutação *missense* provoque a mesma consequência.

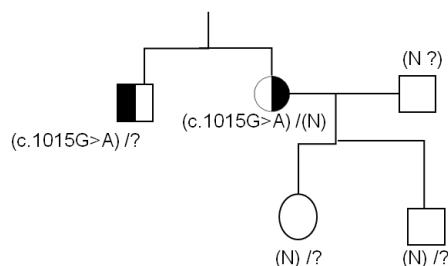
### Mutação c.1015G>A

Esta mutação foi encontrada em 5 casos (casos 7, 11, 13, 17 e 18), quatro dos quais se tratam de heterozigóticos compostos (casos 7, 11, 17 e 18) e um (caso 13) onde apenas se encontrou esta mutação em heterozigotia. Este último trata-se de um caso materno detectado através do rastreio neonatal do seu filho onde foram sequenciados todos os exões e junção exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, não tendo sido identificado mais nenhuma mutação. O que pode suceder se estivermos perante uma grande deleção ou inserção ou se se tratar de uma mutação no promotor. Nestas situações ao estudarmos o DNA genómico apenas estamos a sequenciar um alelo como constatado por Dantas (Dantas et al. 2005) num estudo efectuado a 28 indivíduos.

Foi possível efectuar o estudo molecular ao irmão da mãe e aos dois filhos, onde se observou que o irmão possuía a mesma mutação que o caso 13 e os dois filhos são normais para esta alteração (Figura 17). O irmão embora possua a mesma alteração que o caso 13 em heterozigotia provavelmente trata-se de um portador uma vez que ao contrário da irmã possui um fenótipo bioquímico normal, ligeiro aumento de C5-OH (0,55 µmol/L) no perfil de acilcarnitinas com um perfil de ácidos orgânicos normais e com uma carnitina livre e total normal. O caso 13 no perfil de



acilcarnitinas o marcador C5-OH encontra-se aumentado 5.48  $\mu\text{mol/L}$ , no ácidos orgânicos apresenta aumento do 3-HIVA que está de acordo com o perfil de acilcarnitinas e possui um défice secundário de carnitina. Outra hipótese é a mãe também ser portadora mas apresentar este fenótipo bioquímico devido a gravidez recente e ao stress metabólico do parto.



**Figura 17 - Árvore genealógica do caso 13 onde foi encontrada a mutação**

Nos casos 7 e 17 esta alteração encontra-se em heterozigotia com outras duas alterações já descritas na literatura, a mutação c.463C>T e c.517\_518insT respectivamente. Nos casos 11 e 18 esta alteração encontra-se em heterozigotia com outras duas alterações não descritas na literatura e que vão ser abordados mais à frente.

Esta mutação foi descrita por Baumgartner (Baumgartner et al. 2001) num estudo efectuado a 16 indivíduos com défice em 3-MCC onde demonstrou que indivíduos com esta mutação possuem actividade enzimática residual, aproximadamente 4% do valor controlo.

Num artigo publicado em 2007 por Wolfe (Lynne A. Wolfe 2007) esta mutação é associada aos indivíduos que no perfil de ácidos orgânicos urinários não tem excreção de 3-MCG. A ausência do marcador patognomónico do défice de 3-MCC no perfil de ácidos orgânicos pode ser devido à enzima possuir actividade residual. A concentração da 3-metilcrotonil-CoA é decisiva para a formação da glicina conjugada, 3-MCG, e a ocorrência na urina de acilglicinas reflecte a acumulação intramitocondrial da 3-metilcrotonil-CoA. Não ocorrendo um grande aumento da 3-metilcrotonil-CoA devido a actividade residual da enzima a conjugação com a glicina é diminuída.

Por outro lado, a conjugação da 3-metilcrotonil-CoA com a glicina é catalisada pela acil-CoA: glicina-N-aciltransferase e é possível que nestes pacientes não excretadores também possam ter alterações na actividade da aciltransferase localizado no cromossoma 11.

### 3.1.2. Mutações *missense* novas

Foram encontradas 10 mutações *missense* não descritas na literatura, duas no gene *MCCA* e 8 no gene *MCCB*. No gene *MCCA* uma foi identificada no exão 5, a substituição c.388G>A que origina

a troca de um resíduo de glicina por uma serina (p.G130S), e outra no exão 11, a substituição c.1147G>A que origina a troca de um resíduo de ácido glutâmico por uma lisina (p.E383K). No gene *MCCB* as mutações identificadas foram: no exão 3, a transversão c.203G>T que origina a troca de um resíduo de glicina por uma valina (p.G68V); no exão 4, a transversão c.313G>C que origina a troca de um resíduo de glicina por uma arginina (p.G105R); no exão 5, a substituição c.487A>G que origina a troca de um resíduo de asparagina por ácido aspártico (p.N163D); no exão 6 a transversão c.599T>G que origina a troca de um resíduo de isoleucina por asparagina (p.I200N); no exão 7 a substituição c.688A>G que origina a troca de um resíduo de asparagina por um ácido aspártico (p.N230D); no exão 13 a transversão c.1159T>G que origina a troca de um resíduo fenilalanina por uma valina (p.F387V); no exão 14 a substituição c.1229G>A que origina a troca de um resíduo glicina por um ácido aspártico (p.G410D) e no exão 15 a substituição c.1423G>A que origina a troca de um resíduo glicina por uma arginina (p.G475R).

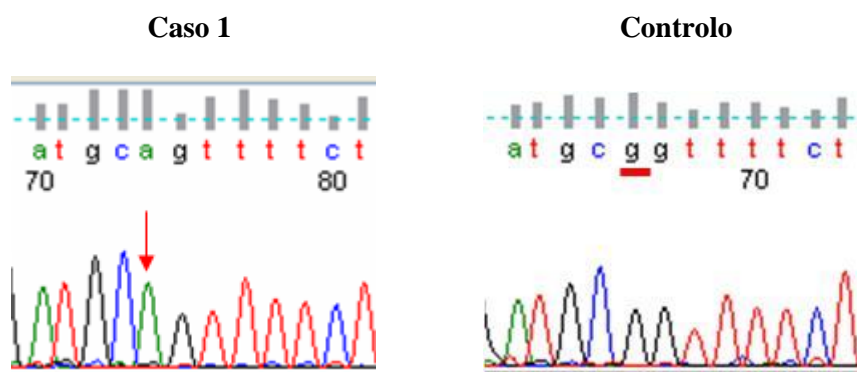
Para avaliar o impacto destas mutações *missense* para além de ter em consideração as características de cada aminoácido foram utilizados os seguintes métodos bioinformáticos: alinhamento de sequências homólogas efectuado através do programa *Clustal W2* e previsão da patogenicidade das mutações pelo programa *Polyphen*.

Como já referido para além das ferramentas bioinformáticas foi efectuada uma análise às características dos aminoácidos uma vez que para o funcionamento normal de uma proteína a conformação tridimensional é a principal determinante da sua função biológica, e alterações na sequência aminoacídica mudam a conformação e logo a sua função (configuração alterada compromete a estabilidade da proteína). Essas alterações são devidas às características específicas de cada aminoácido, mais concretamente por interações não covalentes como ligações de hidrogénio, interações electrostáticas e hidrofóbicas por efeitos geométricos impostos pelo aminoácido que uma vez alterados podem comprometer a estrutura da proteína.

A informação obtida no alinhamento de proteínas homólogas em diferentes espécies é considerado um factor importante para compreender a variação genética em humanos. Quando realizamos análises bioinformáticas de sequências proteicas, identificamos domínios como blocos de “motivos” estruturais ou de sequências que são recorrentes em proteínas estudadas. Devido à sua função biológica existe uma pressão evolutiva para a conservação desses “motivos” no mesmo domínio em proteínas de diferentes espécies. A conservação destas sequências é percebida através de alinhamento múltiplo de sequências de diferentes organismos e indica quais os aminoácidos da proteína que são os possíveis responsáveis de provocar doença se estiverem mutados nos humanos.

### Mutação c.388G>A

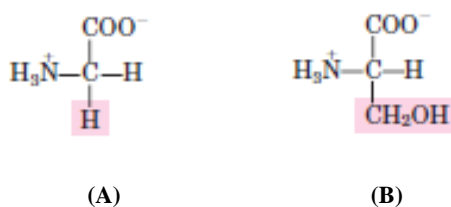
A mutação c.388G>A que origina a substituição de um resíduo de glicina, aminoácido apolar por uma serina, aminoácido polar neutro (p.G130S) no exão 5 do gene *MCCA* foi identificada em homozigotia no caso 1 (Figura 18). Não foi encontrada mais nenhuma alteração após ter sido efectuada a sequenciação de todos os exões e junção exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*.



**Figura 18- Mutação c.388G>A (caso 1).**

Representação parcial da sequência do caso 1, onde se evidencia a mutação c.388G>A, comparada com um controlo normal.

O aminoácido serina possui no radical um grupo hidroxilo que tende a formar pontes de hidrogénio com a cadeia principal ou com o solvente, é esta característica que torna este aminoácido hidrofílico. A glicina possui uma estrutura simples sendo o aminoácido mais pequeno e ao contrário da serina apresenta características hidrofóbicas (Figura 19). A hidrofobicidade é um factor muito importante na estabilidade de uma proteína, uma vez que uma característica geral das proteínas globulares consiste na localização de resíduos hidrofóbicos no interior da proteína enquanto os resíduos polares ou carregados se situam à superfície da proteína.



**Figura 19- Estrutura linear dos aminoácidos glicina (A) e serina (B), com os radicais assinalados.**

(Nelson and Cox 2004).

Para avaliar a conservação do aminoácido glicina, foi efectuada uma comparação da sequência proteica com sequências de outros organismos recorrendo ao programa *clustal W2*. O alinhamento

## Resultados e Discussão

das sequências homólogas mostra que para esta posição o aminoácido glicina se encontra conservado nas diversas sequências proteicas das espécies analisadas (Figura 20). Isto sugere que este resíduo seja importante para a estrutura e/ou função da enzima 3-MCC e que esta mutação seja provavelmente responsável pelo fenótipo bioquímico.



Figura 20- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCA*.

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

A previsão efectuada pelo programa informático *Polyphen* mostra que esta alteração (p.G130S) tem grande probabilidade de ser causadora da doença. Ou seja, é provável que a função ou estrutura da proteína correspondente seja afectada. A diferença de *scores* dos dois aminoácidos envolvidos na substituição é superior a dois (2.6) e de acordo com *Polyphen* valores elevados desta diferença podem indicar que a substituição seja rara e provavelmente patogénica (Figura 21).

Query				
Acc number	Position	AA1	AA2	Description
Q96RQ3	130	G	S	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1; AltName: Full=MCCase subunit alpha; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit; Flags: Precursor; LENGTH: 725 AA

Prediction				
This variant is predicted to be probably damaging				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	FT alignment structure	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.609
Remarks				
Closest contact with functional site: ARG 292A, distance 4.091 Å				

Figura 21 – Previsão da patogenicidade da alteração c.388G>A no gene *MCCA* através do programa *Polyphen*.

Neste caso, de acordo com a previsão a troca do aminoácido glicina por serina permite um contacto mais próximo com local funcional, uma arginina na posição 292, devido provavelmente ao tamanho do aminoácido substituído e as suas características hidrofílicas. Esta aproximação do local funcional deve alterar a conformação da proteína e logo a sua estabilidade.

Foram também efectuados estudos moleculares aos pais que mostraram ser heterozigóticos para esta nova alteração (Figura 22).

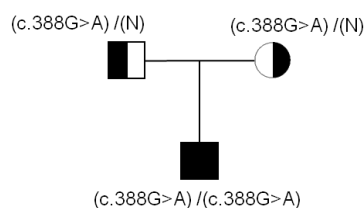


Figura 22 – Árvore genealógica do caso 1 onde foi encontrada a mutação causal.

De acordo com os resultados obtidos e tendo em conta o estudo de co-segregação efectuado aos pais é possível concluir que a mutação c.388G>A é possivelmente patogénica e deve comprometer a estrutura e funcionalidade proteica.

### Mutação c.1147G>A

A substituição c.1147G>A que origina a troca de um resíduo de ácido glutâmico, aminoácido polar ácido, por uma lisina, aminoácido polar básico (p.E383K) foi identificada no exão 11 do gene *MCCA* em heterozigotia no caso 2.

Esta substituição representa uma alteração significativa uma vez que a troca é entre um aminoácido ácido por um básico (Figura 23). O aminoácido lisina possui dois grupos amino que lhe confere carga positiva, ao contrário do ácido glutâmico que possui dois grupos carboxílico dando carga negativa a este aminoácido.

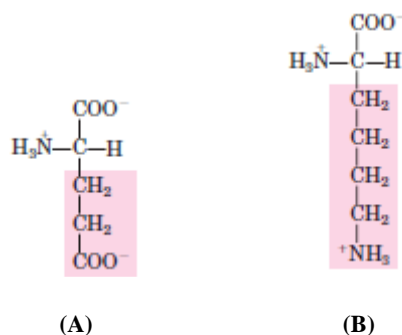
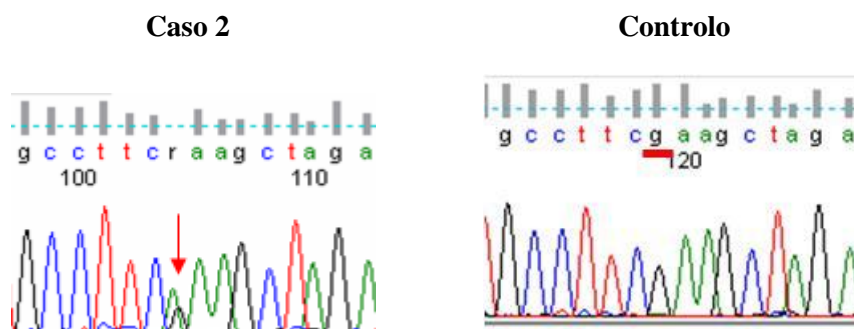


Figura 23- Estrutura linear dos aminoácidos ácido glutâmico (A) e lisina (B), com os radicais assinalados.

(Nelson and Cox 2004).

Neste caso 2 apenas se encontrou esta alteração num dos alelos (Figura 24) e embora tenham sido sequenciados todos os exões e junções exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, não foi identificada mais nenhuma alteração.



**Figura 24- Mutação c.1147G>A (caso 2).**

Representação parcial da sequência do caso 2, onde se evidencia a mutação c.1147G>A, comparada com um controlo normal.

Esta nova mutação p.E383K localiza-se próxima da mutação p.R385S. A mutação p.R385S está descrita como possuindo um efeito dominante negativo sobre o alelo normal devido à sua influência sobre a ligação do bicarbonato.

O alinhamento entre espécies realizado no *Clustal W2* apresentado na Figura 25 mostra que esta região é muito conservada como já descrito por Baumgartner et al. para a mutação R385S. Estas alterações encontram-se numa região que forma uma “bolsa” carregada positivamente e provavelmente responsável para a ligação do bicarbonato. A substituição do aminoácido pode destabilizar a “bolsa” e reduzir a ligação do bicarbonato.



**Figura 25- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene MCCA.**

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

O resultado da previsão do impacto desta alteração na estrutura proteica, realizada através da ferramenta bioinformática *Polyphen*, está representado na Figura 26.

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q96RQ3	383	E	K	RecName: Full=Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1; AltName: Full=MCCase subunit alpha; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit; Flags: Precursor; LENGTH: 725 AA
Prediction				
This variant is predicted to be probably damaging				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	FT alignment structure	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.517
Remarks				
Hydrophobicity change at buried site; normed accessibility: 0.00, hydrophobicity change: 1.93				
Charge change at buried site: substitution E -> K, normed accessibility: 0.00				

Figura 26 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1147G>A no gene *MCCA* através do programa *Polyphen*.

A previsão do impacto da mutação p.E383K revela-a como provável patogénica uma vez que a diferença de *scores* entre os dois aminoácidos é um valor superior a 2 (2.517). Por outro lado a substituição do ácido glutâmico pela lisina altera a carga e a hidrofobicidade no local da substituição, colocando possivelmente em causa a estabilidade da proteína. Por esta razão, a função ou estrutura do polipéptido em causa podem ser afectadas sendo esta alteração responsável pelo fenótipo bioquímico mesmo encontrando-se em heterozigotia como se verificou para a mutação R385S.

Foi realizado o estudo molecular à mãe que não apresenta esta alteração sendo o pai o provável portador da alteração.

#### Mutação c.203G>T

A mutação c.203G>T que origina a transversão de um resíduo de glicina, aminoácido apolar, por uma valina, aminoácido apolar (p.G68V) foi identificada no exão 3 em heterozigotia no gene *MCCB* do caso 8 (Figura 27). Após sequenciação de todos os exões e junção exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, foi identificada outra mutação *missense* no exão 7 do gene *MCCB* não descrita na literatura.

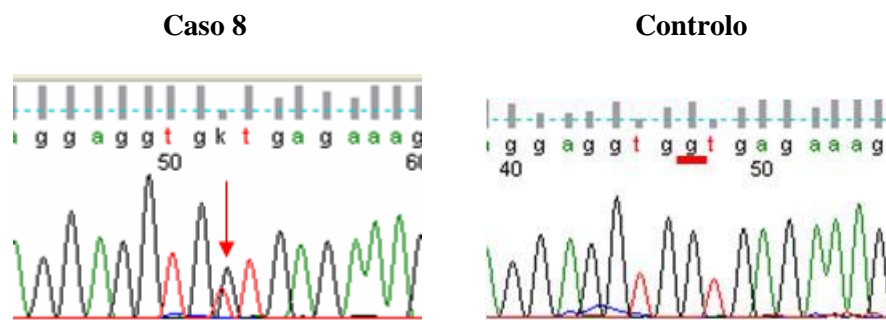


Figura 27- - Mutação c.203G>T (caso 8).

Representação parcial da sequência do caso 8, onde se evidencia a mutação c.203G>T, comparada com um **controle** normal.

Embora os aminoácidos envolvidos sejam ambos aminoácidos apolares, as cadeias laterais da valina tendem a agrupar-se dentro das proteínas por meio de interações hidrofóbicas estabilizando a estrutura das proteínas. Já a glicina possui uma estrutura simples em que a sua cadeia lateral é muito pequena, um hidrogênio, não contribuindo para as interações hidrofóbicas (Figura 28).

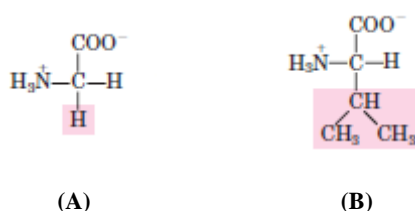


Figura 28- Estrutura linear dos aminoácidos glicina (A) e valina (B), com os radicais assinalados.

(Nelson and Cox 2004).

As sequências de resíduos que abrangiam o codão alterado foram comparadas com outras sequências proteicas de outras espécies apresentado na Figura 29, revelando que o resíduo em causa é conservado bem como a zona envolvente. O resíduo mutante (valina) nunca está presente nas proteínas homólogas embora em algumas espécies a glicina seja substituída por serina.



Figura 29- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.



De acordo com a previsão obtida no *Polyphen*, esta alteração p.G68V é classificada como provável patogénica ou seja é provável que a função ou estrutura da proteína correspondente seja afectada (Figura 30).

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	68	G	V	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor; LENGTH: 563 AA

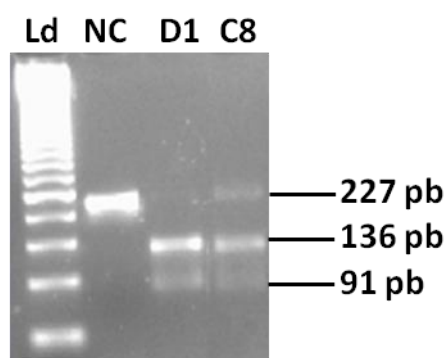
  

Prediction				
This variant is predicted to be probably damaging				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.105

Figura 30 - Previsão da patogenicidade da alteração c.203G>T no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.

Este resultado é baseado em múltiplos alinhamentos entre diferentes espécies e nas diferenças de *scores* dos dois aminoácidos envolvidos na substituição, diferença esta que é superior a dois (2.105), que de acordo com *Polyphen* valores elevados desta diferença podem indicar que a substituição seja rara e provável patogénica.

Dado que a substituição ocorre entre aminoácidos com características semelhantes, foi realizado o estudo populacional para esta alteração em 200 alelos controlo (100 indivíduos controlo). Para este estudo utilizou-se a endonuclease de restrição *HphI* que reconhece uma sequência específica (neste caso a normal) e corta 8 pares de bases a jusante dessa sequência, ou seja, a ocorrência de uma mutação na sequência específica elimina um local de corte para a enzima *HphI*. O facto de a alteração não estar presente nesta amostra populacional sugere que esta alteração tenha uma baixa frequência nesta população e uma natureza causal (Figura 31).



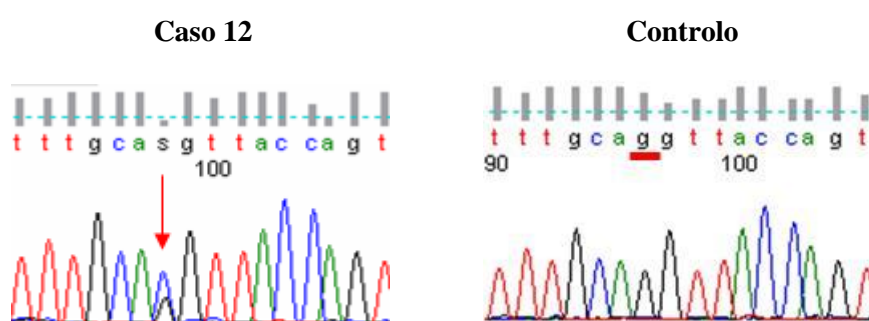
**Figura 31 – Análise de restrição do produto de PCR do exão 3 no caso 8 com a endonuclease de restrição *HphI*.**

A mutação elimina um local de corte o que é demonstrado pela presença de três fragmentos (227, 136 e 91pb) no caso 8 (C8-heterozigótico para a mutação) a enzima corta a sequência normal (dois fragmentos 136 e 91) D1– controlo digerido; ND – controlo não digerido; Ld- lader.

Tendo em conta o estudo populacional efectuado em 100 indivíduos controlo, a sua conservação ao longo das diferentes espécies e o resultado preditivo do *Polyphen* pode-se considerar que esta mutação, juntamente com a alteração no outro alelo, é responsável pelo fenótipo bioquímico observado.

### Mutação c.313G>C

A mutação c.313G>C origina a transversão de um resíduo de glicina, aminoácido apolar, por uma arginina, aminoácido polar básico (p.G105R) no exão 4 do gene *MCCB* foi identificado no caso 12 em heterozigotia (Figura 32).

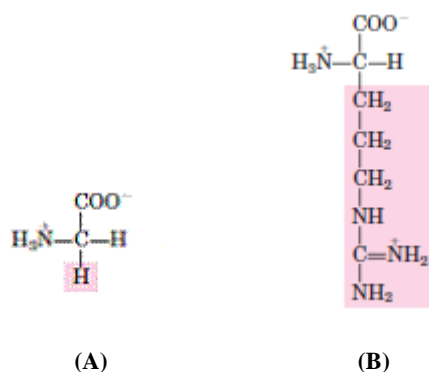


**Figura 32 - Mutação c.313G>C (caso 12).**

Representação parcial da sequência do caso 12, onde se evidencia a mutação c.313G>C, comparada com um controlo normal.

Tridimensionalmente, os dois aminoácidos exibem características distintas. Enquanto a arginina apresenta um carácter básico com características hidrofílicas e possui um radical R com o grupo amino, a glicina é um aminoácido apolar muito simples com características hidrofóbicas (Figura

33). Sendo assim, e uma vez que a arginina é um aminoácido de maiores dimensões, a sua substituição pela glicina pode comprometer no empacotamento e estabilidade da proteína.



**Figura 33 - Estrutura linear dos aminoácidos glicina (A) e arginina (B), com os radicais assinalados.**  
(Nelson and Cox 2004).

As sequências de resíduos que abrangiam o codão alterado foram comparadas com outras proteínas homólogas de outras espécies (Figura 34) revelando que os resíduos em causa são conservados. O resíduo mutante, arginina, nunca está presente nas proteínas homólogas, embora em algumas espécies a glicina seja substituída por alanina.

Homo	ERVEHIKLGGEKARALHISRGKLLPRERIDNLIDPGSPFLELSQFAGYQLYDNEEVPGG	117
Rattus	ERAQYVRLGGSEKARARHTSRGKLLPRIDNLIDPGSPFLEFSQFAGYKLYGEEVPAG	117
Mus	ERAQYVRLGGSEKARARHTSRGKLLPRIDNLIDPGSPFLEFSQFAGYQLYGDNEVPAG	117
Pan	ERVEHIKLGGEKARALHISRGKLLPRERIDNLIDPGSPFLELSQFAGYQLYDNEEVPGG	117
Macaca	ERVEHIKLGGEKARALHISRGKLLPRERIDDLIDPGSPFLELSQFAGYQLYDNEEVPGG	117
Danio	DRAEKIKLGGEKARNLHTSRGKLLPRERIDRLIDPGSPFLEFSQFAAYQLYKKEVPAG	120
Xenopus	ERAQKIRLGGGDKARALHTSRGKLLPRERIDRLIDPGSAFLEFSQFAGYQLYGNNEVPAG	118

**Figura 34- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.**

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

A previsão do *Polyphen* revela que a alteração p.G105R é provavelmente benigna, isto é, é provável que a estrutura ou função da proteína não seja afectada (Figura 35). Este resultado é obtido devido a diferenças de *scores* dos aminoácidos envolvidos na substituição uma vez que o valor resultante é de 0.508 e de acordo com o *Polyphen* valores inferiores a 0.5 e baseados apenas no alinhamento entre espécies são consideradas alterações benignas.

Query				
Acc number	Position	AA1	AA2	Description
Q9HCC0	105	G	R	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA: carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor, LENGTH: 563 AA
Prediction				
This variant is predicted to be benign				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 0.508

Figura 35 - Previsão da patogenicidade da alteração c.313G>C no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.

Esta alteração foi encontrada num caso materno identificado no rastreio neonatal do filho. Foi realizado o estudo familiar à mãe e a dois filhos (como demonstrado na Figura 36), sendo os filhos portadores desta nova alteração.

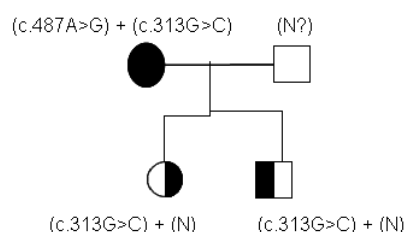
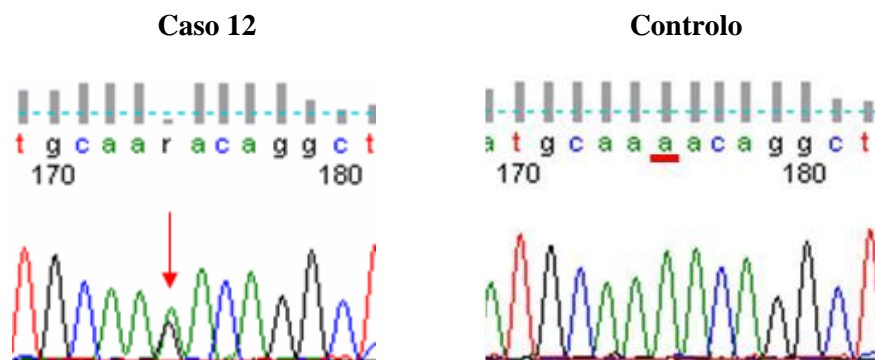


Figura 36 – Árvore genealógica do caso 12 onde foi encontrada a mutação causal.

Embora o resultado da previsão da patogenicidade da alteração tenha sido benigna, a substituição de uma glicina por uma arginina tem um grande impacto na medida em que estes são estruturalmente aminoácidos muito diferentes e estas diferenças sugerem que haja um comprometimento no empacotamento e estabilidade da proteína. O facto desta alteração estar em heterozigotia com outra alteração nova (descrita mais à frente) e, após se terem sequenciado ambos os genes não se ter encontrado mais nenhuma alteração, sugere que esta alteração p.G105R seja responsável pelo fenótipo bioquímico.

### Mutação c.487A>G

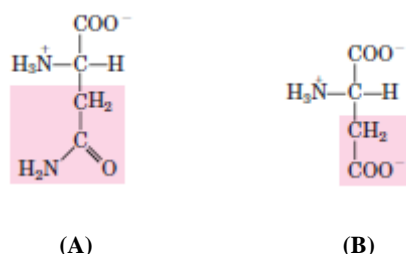
A mutação c.487A>G que origina a substituição de um resíduo de asparagina, aminoácido polar neutro, por ácido aspártico, aminoácido polar ácido, na posição 163 (p.N163D) foi identificada em heterozigotia no caso 12 no exão 5 do gene *MCCB* (Figura 37).



**Figura 37- Mutação c.487A>G (caso 12).**

Representação parcial da sequência do caso 12, onde se evidencia a mutação c.487A>G, comparada com um controlo normal.

O aminoácido asparagina possui um radical mais solúvel em água, ou mais hidrofílica, que os dos aminoácidos apolares, porque contém grupos funcionais que formam ligações de hidrogénio com a água. A polaridade da asparagina resulta dos seus grupos amida. O ácido aspártico embora também seja um aminoácido hidrofílico possui carga negativa que lhe é conferido por possuir mais um grupo carboxílico, para além do grupo carboxílico que já faz parte da estrutura de todos os aminoácidos (Figura 38).



**Figura 38- Estrutura linear dos aminoácidos asparagina (A) e ácido aspártico (B), com os radicais assinalados.**  
(Nelson and Cox 2004).

Esta mutação c.487A>G foi identificada em heterozigotia com a mutação c.313G>C já referida anteriormente, tratando-se portanto de um heterozigótico composto. Após sequenciação de todos os exões e junção exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, não foi encontrada mais nenhuma alteração prevendo-se que estas alterações sejam responsáveis neste caso pelo fenótipo bioquímico.

O alinhamento entre espécies efectuado através do programa *Clustal W2* (Figura 39) mostra que para esta posição o aminoácido asparagina se encontra conservado em diversas espécies. Isto sugere que este resíduo seja importante para a estrutura e/ou função da enzima 3-MCC e que esta mutação seja provavelmente responsável pelo fenótipo bioquímico.



Homo	GIITGIGRVSGVECMIIANDATVKG GAYYPVTVKKQLRAQEIAMQNR LPCIYLVDSGGAY	177
Rattus	GIITGIGRVSGVECMIVANDATVKG GTTYYPVTVKKHVRAQEIALQNR LPCIYLVDSGGAN	177
Mus	GIITGIGRVSGVECMIVANDATVKG GTTYYPVTVKKHVRAQEIALQNR LPCIYLVDSGGAN	177
Pan	GIITGIGRVSGVECMIIANDATVKG GAYYPVTVKKQLRAQEIAMQNR LPCIYLVDSGGAY	177
Macaca	GIITGIGRVSGVECMIIANDATVKG GTTYYPVTVKKQLRAQEIAMQNR LPCIYLVETGFYY	177
Danio	GIITGIGRVSGVECLIVANDATVKG GTTYYPVTVKKHLRAQEI AQNH LPCIYLVDSGGAN	180
Xenopus	GIISGIGRVSGVECLIVANDATVKG GSYYPI TVKKHLRAQEIAMQNN LPCVYLVDSGGAN	178

Figura 39- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

A elevada probabilidade desta alteração ser patogénica é suportada pelo resultado obtido do programa informático *Polyphen* (Figura 40) onde a diferença de *scores* entre os dois aminoácidos é um valor superior a 2 (2.365).

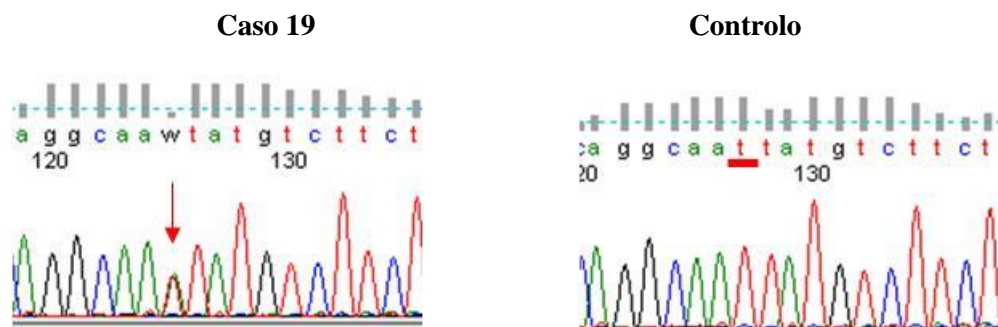
Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	163	N	D	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor; LENGTH: 563 AA
Prediction				
This variant is predicted to be probably damaging				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.365

Figura 40 - Previsão da patogenicidade da alteração c.487A>G no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.

Tendo em consideração a análise estrutural dos aminoácidos envolvidos, a sua conservação ao longo das diferentes espécies e o resultado preditivo do *Polyphen*, pode-se considerar que existe uma forte probabilidade desta variação ser patogénica e responsável pelo fenótipo bioquímico.

### Mutação c.599T>G

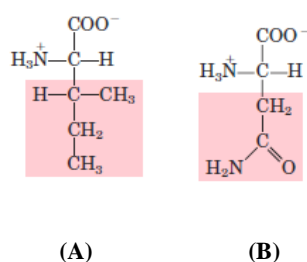
A mutação c.599T>G que origina a substituição de um resíduo de isoleucina, aminoácido apolar, por resíduo de asparagina, aminoácido polar neutro (p.I200N) foi identificada no exão 6 em heterozigotia no caso 19 (Figura 41). Este caso refere-se a um caso materno assintomático detectado no rastreio neonatal através do aumento de C5-OH no perfil de acilcarnitinas do seu filho.



**Figura 41 - Mutação c.599T>G (caso 19).**

Representação parcial da sequência do caso 19, onde se evidencia a mutação c.599T>G, comparada com um controlo normal.

Como já vimos anteriormente no que se refere à estrutura tridimensional dos aminoácidos, a isoleucina é um aminoácido com características hidrofóbicas em que as suas cadeias laterais tendem a agrupar-se dentro das proteínas por meio de interações hidrofóbicas estabilizando a estrutura das proteínas; é um aminoácido que se apresenta para o interior da proteína. Já a asparagina é um aminoácido com características hidrofílicas, mais solúvel na água, porque possui grupos funcionais que formam pontes de hidrogénio com a água. Este aminoácido na estrutura da proteína encontra-se no seu exterior (Figura 42). Uma vez que a análise estrutural mostrou que os aminoácidos envolvidos possuem características diferentes, é possível que estas diferenças comprometam a estrutura da proteína.

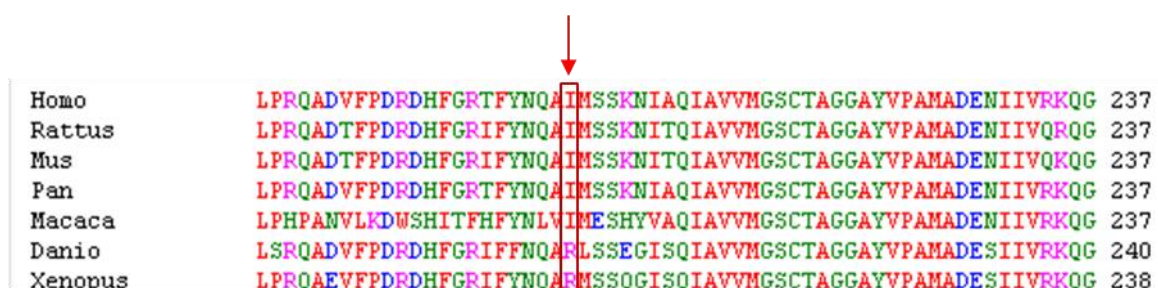


**Figura 42 - Estrutura linear dos aminoácidos isoleucina (A) e asparagina (B), com os radicais assinalados.**

(Nelson and Cox 2004).

Foi efectuado o alinhamento entre várias proteínas homólogas através do programa bioinformático *Clustal W2* para verificar a conservação deste resíduo, isoleucina, nas diversas espécies. Como podemos verificar na Figura 43 o resíduo mutante, asparagina, nunca está presente nas proteínas homólogas embora em algumas espécies a isoleucina seja substituída por arginina.





Homo	LPRQADVFPDRDHFGRTFYNQAIMSSKNIAQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADENIIVRKQG	237
Rattus	LPRQADTFPDRDHFGRIFFYNQAIMSSKNITQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADENIIVQRQG	237
Mus	LPRQADTFPDRDHFGRIFFYNQAIMSSKNITQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADENIIVQKQG	237
Pan	LPRQADVFPDRDHFGRTFYNQAIMSSKNIAQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADENIIVRKQG	237
Macaca	LPHPANVLKDUSHITFHFYNLVIMESHYVAQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADENIIVRKQG	237
Danio	LSRQADVFPDRDHFGRIFFYNQAIMSSKNIAQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADESIIVRKQG	240
Xenopus	LPRQAEVFPDRDHFGRIFFYNQAIMSSQGISQIAVVMGSC	TAGGAYVPAMADESIIVRKQG	238

**Figura 43 - Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.**

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

De acordo com a previsão efectuada pelo programa bioinformático *Polyphen* esta alteração apresenta uma diferença de *scores* dos aminoácidos envolvidos na substituição de 0.243, classificada como uma alteração benigna sendo pouco provável que a função ou estrutura proteica sejam afectadas (Figura 44).

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	200	I	N	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor, LENGTH: 563 AA
Prediction				
This variant is predicted to be benign				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 0.243

**Figura 44 - Previsão da patogenicidade da alteração c.599T>G no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.**

Esta mutação foi identificada no caso 19 em heterozigotia associada a uma outra mutação localizada no intrão 12 num local de consenso de *splicing*, não tendo sido detectada mais nenhuma alteração ao longo do gene *MCCB*. Embora de acordo com a análise efectuada esta mutação seja classificada como sendo benigna, é provável que em associação com a mutação de *splicing* seja responsável pelo fenótipo bioquímico e clínico apresentado por este caso, uma vez que se trata de uma mãe assintomática.



### Mutação c.688A>G

A mutação c.688A>G que origina a substituição de um resíduo de asparagina, aminoácido polar neutro, por um ácido aspártico aminoácido polar ácido (p.N230D), foi identificada no exão 7 em heterozigotia no caso 6 e 8, e em homozigotia no caso 14 (Figura 45).

Foi a mutação nova mais frequentemente identificada neste estudo no gene *MCCB*, num total de 10 alelos mutados foi encontrada em 4 alelos.

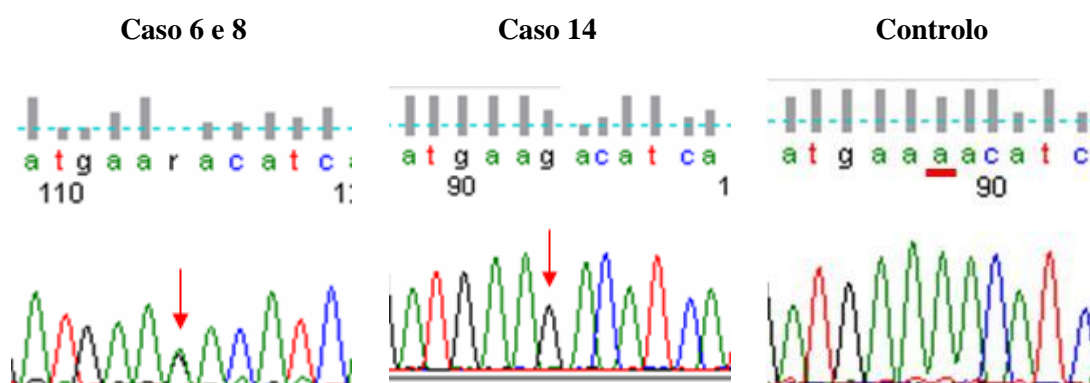


Figura 45- - Mutação c.688A>G (caso 6, 8 e 14).

Representação parcial da sequência do caso 6 e 8, onde se evidência a mutação c.688A>G em heterozigotia e do caso 14 onde se evidência a mutação c.688A>G em homozigotia, comparada com um controlo normal.

No que se refere à estrutura dos aminoácidos, já foi apresentado anteriormente que os aminoácidos envolvidos nesta substituição apresentam diferenças na carga; trata-se de um aminoácido polar neutro e outro polar ácido.

As sequências de resíduos que abrangiam o codão alterado foram comparadas com outras espécies apresentado na Figura 46, revelando que os resíduos em causa são conservados em algumas espécies. O resíduo mutante, ácido aspártico, nunca está presente nas proteínas homólogas embora em algumas espécies o aminoácido asparagina seja substituído por serina.

Homo	LPRQADVFPDRDHFGRTFYNQAIMSSKNIAQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADENIIVRKQG	237
Rattus	LPRQADTFPDRDHFGRIIFYNQAIMSSKNITQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADENIIVQRQG	237
Mus	LPRQADTFPDRDHFGRIIFYNQAIMSSKNITQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADENIIVQKQG	237
Pan	LPRQADVFPDRDHFGRTFYNQAIMSSKNIAQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADENIIVRKQG	237
Macaca	LPHPANVLKDWSHITTFHYNLVIMESHYVAQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADENIIVRKQG	237
Danio	LSRQADVFPDRDHFGRIFFNQARLSSEGISQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADESIIVRKQG	240
Xenopus	LPRQAEVFPDRDHFGRIIFYNQARMSSQGISQIAVVMGSC	AGGAYVPAMADESIIVRKQG	238

Figura 46- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

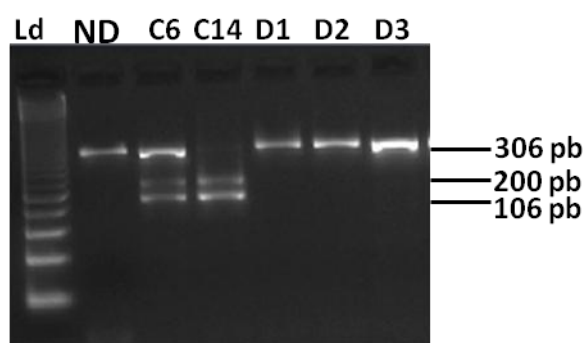
## Resultados e Discussão

Baseado no alinhamento entre espécies, o programa *Polyphen* prevê que esta alteração seja benigna com uma diferença de *scores* dos aminoácidos envolvidos na substituição de 1.468, dando como pouco provável que a função ou estrutura proteica seja afectada (Figura 47).

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	230	N	D	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor; LENGTH: 563 AA
Prediction				
This variant is predicted to be benign				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.468

**Figura 47 - Previsão da patogenicidade da alteração c.688A>G no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.**

Como esta mutação cria um local de corte para a enzima *MboII* foi possível realizar o estudo populacional para esta alteração em 200 alelos controlo (100 indivíduos controlo). O facto da alteração não estar presente nesta amostra populacional sugere que esta alteração tenha uma baixa frequência nesta população e uma natureza causal (Figura 48).



**Figura 48 – Análise de restrição do produto de PCR do exão 7 no caso 6 e 14 com a enzima de restrição *MboII*.**

A mutação cria um local de corte o que é demonstrado pela presença de dois fragmentos (200 e 106 pb) no caso 14 (C14-homozigotico para a mutação) e de três fragmentos (306, 200 e 106 pb) no caso 6 (C6-heterozigotico para a mutação); ND – controlo não digerido; D1, D2, D3 – controlos digeridos.

No caso 6 só foi identificada esta alteração após terem sido sequenciados todos os exões e junções exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, estando possivelmente a alteração do outro alelo no

promotor ou por se tratar de uma grande deleção ou inserção como já descrito por outros autores (Baumgartner et al. 2001).

Foi também identificado em heterozigotia um polimorfismo descrito c.641G> C (G214A) no mesmo exão, podendo este polimorfismo em conjunto com a mutação mencionada ser responsável pelo fenótipo bioquímico observado. Só foi possível efectuar os estudos moleculares à mãe que se apresenta normal para esta alteração mas que possui o polimorfismo em heterozigotia. Este polimorfismo referido no NCBI (rs277995) é pouco frequente na população em geral (Figura 49).

rs277995: Allele Frequencies in HapMap Populations			
Panel	Description	Frequency of G (ref)	Frequency of C
ASW(A)	African ancestry in Southwest USA	NA	NA
CEU(C)	Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection	100%	0%
CHB(H)	Han Chinese in Beijing, China	100%	0%
CHD(D)	Chinese in Metropolitan Denver, Colorado	NA	NA
GIH(G)	Gujarati Indians in Houston, Texas	NA	NA
JPT(J)	Japanese in Tokyo, Japan	100%	0%
LWK(L)	Luhya in Webuye, Kenya	NA	NA
MEX(M)	Mexican ancestry in Los Angeles, California	NA	NA
MKK(K)	Maasai in Kinyawa, Kenya	NA	NA
TSI(T)	Toscans in Italy	NA	NA
YRI(Y)	Yoruba in Ibadan, Nigeria	100%	0%

**Figura 49- Tabela frequência alélica do polimorfismo rs277995.**

(<http://www.hapmap.org/>)

Para pesquisar a frequência deste polimorfismo foi utilizado a base de dados *Hapmap*. *Hapmap* é um projecto internacional com o intuito de identificar as semelhanças e diferenças genéticas em seres humanos, ou seja, objectivo é comparar as sequências genéticas de diferentes indivíduos para identificar regiões cromossómicas onde as variações genéticas são compartilhadas. Este projecto descreve o que essas variantes são, onde ocorrem no nosso DNA e como estão distribuídos entre as pessoas dentro das mesmas populações e entre as populações em diferentes partes do mundo.

No caso 8 trata-se de um heterozigótico composto com a mutação referida anteriormente c.203G>T em que a troca de aminoácido é entre uma glicina e uma valina ambos aminoácidos apolares mas de acordo com o estudo populacional concluiu-se que a alteração tem uma baixa frequência nesta população. Este caso apresenta no perfil de acilcarnitinas ligeiro aumento de C5-OH e no perfil de ácidos orgânicos aumento de 3-HIVA sem excreção de 3-MCG. É provável, e de acordo com o fenótipo bioquímico observado, que estas mutações não comprometam na totalidade a enzima

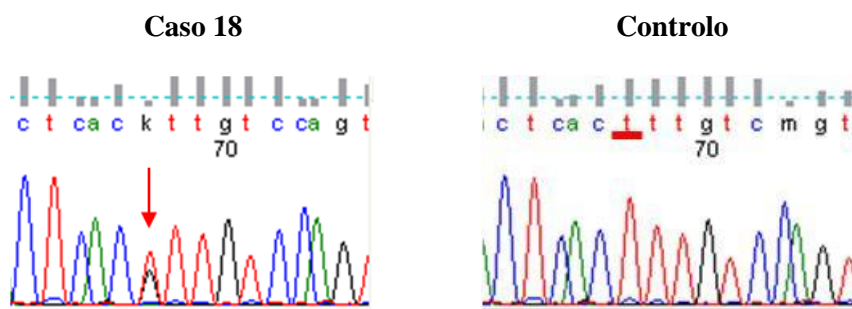
possuindo esta alguma actividade enzimática suficiente para evitar acumulação do 3-metilcrotonil-CoA na mitocôndria. Esta acumulação é necessária para que ocorra a conjugação com a glicina para formar 3-MCG como descrito por Wolfe (Lynne A. Wolfe 2007; Dirik et al. 2008).

O caso 14 é uma mãe, detectada através do rastreio neonatal do filho, que obteve valores de C5OH no perfil de acilcarnitinas de 3,0  $\mu\text{mol/L}$  (normal < 0,52). Neste caso a alteração apresenta-se em ambos os alelos e foi efectuado o estudo molecular ao filho que também é portador da alteração. Não foi identificada mais nenhuma alteração em ambos os gene *MCCB* e *MCCA*.

Considerando a análise da estrutura dos aminoácidos, a conservação do aminoácido nas diferentes espécies e o estudo populacional efectuado em 100 indivíduos controlo pode-se considerar esta alteração como a responsável pelo fenótipo bioquímico observado nos 3 casos.

### Mutação c.1159T>G

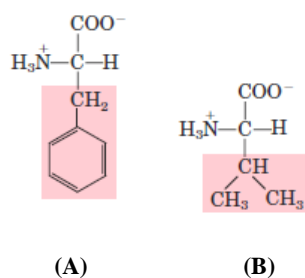
A mutação c.1159T>G que origina a substituição de um resíduo de fenilalanina, aminoácido apolar, por resíduo de valina, aminoácido apolar (p.F387V) foi identificada no exão 13 em heterozigotia no caso 18 (Figura 50).



**Figura 50 - Mutação c.1159T>G (caso 18).**

Representação parcial da sequência do caso 18, onde se evidência a mutação c.1159T>G, comparada com um controlo normal.

A análise estrutural dos aminoácidos intervenientes na substituição mostra que ambos os aminoácidos são apolares, apresentam radicais hidrófobicos (sendo portanto insolúveis na água) e localizam-se no interior da proteína. O que distingue estes aminoácidos é a presença de um anel aromático no aminoácido fenilalanina. Uma vez que a estrutura tridimensional da fenilalanina é determinada por efeitos geométricos impostos pelo aminoácido, é provável que esta substituição possa conduzir à destabilização da proteína por interferir com o empacotamento tridimensional desta (Figura 51).



**Figura 51 - Estrutura linear dos aminoácidos fenilalanina (A) e valina (B), com os radicais assinalados.**

(Nelson and Cox 2004).

Foi efectuado o alinhamento entre várias proteínas homólogas através do programa bioinformático *Clustal W2* para verificar a conservação deste resíduo, fenilalanina, nas diversas espécies. Como podemos verificar na Figura 52 o resíduo mutante, valina, nunca esta presente nas proteínas homólogas. Pelo contrário, esta alteração encontra-se numa zona em que se verifica um elevado grau de conservação o que sugere que estes resíduos aminoacídicos são críticos para a função da proteína.

Homo	GFARIFGYPVGIVGNNGVLFSESAKKGTHFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGREYEAEG	417
Rattus	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGAFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGKDYEAEG	417
Mus	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGAFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGRDYEAEG	417
Pan	GFARIFGYPVGIVGNNGVLFSESAKKGTHFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGREYEAEG	417
Macaca	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGTHFIQVCCQRNIPLLFLQNVTFMVGREYEAEG	417
Danio	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGTHFIELCCQRNIPLLFLQNITGFMVGREYEAAG	420
Xenopus	GFARIYGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGTHFELQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGRDYEAAG	418

**Figura 52- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.**

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

De acordo com a previsão efectuada pelo programa bioinformático *Polyphen* esta alteração apresenta uma diferença de *scores* dos aminoácidos envolvidos na substituição de 3.279, sendo classificada como uma alteração patogénica logo é provável que a função ou estrutura proteica sejam afectadas (Figura 53).

Neste caso 18 esta alteração encontra-se em heterozigotia com outra mutação descrita na literatura e já mencionada anteriormente (p.V339M). As alterações identificadas estão de acordo com o fenótipo bioquímico, uma vez que este paciente apresenta aumento de C5-OH no perfil de acilcarnitinas e no perfil de ácidos orgânicos apenas apresenta aumento de 3-HIVA que está de acordo com o descrito para a mutação p.V339M por Wolfe (Lynne A. Wolfe 2007).

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	387	F	V	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor; LENGTH: 563 AA
Prediction				
<b>This variant is predicted to be probably damaging</b>				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 3.279

Figura 53 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1159T>G no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.

Foi efectuado o estudo molecular à mãe que demonstrou ser portadora desta nova alteração.

Com base na análise estrutural dos aminoácidos envolvidos, na sua conservação ao longo das diferentes espécies e no resultado preditivo do *Polyphen*, pode-se considerar que existe uma forte probabilidade desta variação ser patogénica e responsável pelo fenótipo bioquímico.

### Mutação c.1229G>A

A mutação c.1229G>A que origina a substituição de um resíduo glicina, aminoácido apolar, por um ácido aspártico aminoácido polar ácido (p.G410D), foi identificada no exão 14 em homozigotia no caso 9 (Figura 54).

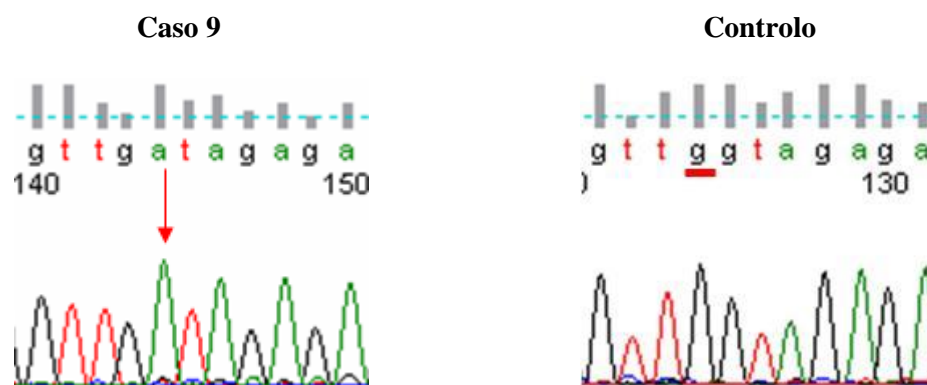


Figura 54 - Mutação c.1229G>A (caso 9).

Representação parcial da sequência do caso 9, onde se evidencia a mutação c.1229G>A em homozigotia, comparada com um controlo normal.

Como já foi referido anteriormente, o aminoácido glicina é o aminoácido que possui a estrutura mais pequena e mais simples; apenas tem um hidrogénio como radical e embora seja hidrofóbico



não participa nas interações hidrofóbicas que ocorrem no interior da proteína. O ácido aspártico é um aminoácido hidrofílico que possui dois grupos carboxílicos o que lhe confere carga negativa. Embora a glicina não participe nas interações hidrofóbicas importantes para o empacotamento da proteína não deixa de ser um aminoácido hidrofóbico, ou seja que está presente no interior da proteína. Este aminoácido é substituído por outro com características diferentes, hidrofílico, que está presente na superfície da proteína.

O alinhamento entre 7 espécies efectuado através do programa informático *Clustal W2* apresentado na Figura 55 mostra que a posição 410 é uma posição muito conservada entre as espécies analisadas, assim como a zona envolvente. Podemos então dizer que se trata de uma alteração com grande probabilidade ser patogénica uma vez todas as espécies usadas no alinhamento apresentam o mesmo aminoácido na referida posição.



Homo	GFARIFGYPVGIVGNNGVLFSESAKKGTHFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGREYEAEG	417
Rattus	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGAFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGRDYEAEG	417
Mus	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGAFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGRDYEAEG	417
Pan	GFARIFGYPVGIVGNNGVLFSESAKKGTHFVQLCCQRNIPLLFLQNITGFMVGREYEAEG	417
Macaca	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGTHFIQVCCQRNIPLLFLQNVTFGMVGREYEAEG	417
Danio	GFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGTHFIELCCQRNIPLLFLQNITGFMVGREYEAAG	420
Xenopus	GFARIYGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGTHFIQLCCQRNIPLIFLQNITGFMVGRDYEAAG	418

**Figura 55-** Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

Esta probabilidade da alteração ser patogénica é reforçada pelo resultado obtido do programa *Polyphen* (Figura 56) que classifica esta alteração como sendo patogénica com um grau de confiança elevado, apresentando diferença de *scores* dos aminoácidos envolvidos de 2.6, e portanto capaz de afectar a função e/ou estrutura da proteína.

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	410	G	D	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor; LENGTH: 563 AA
Prediction				
<b>This variant is predicted to be probably damaging</b>				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
<b>probably damaging</b>	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.651

Figura 56 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1229G>A no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.

Esta previsão foi baseada no alinhamento entre espécies e proteínas homólogas, onde de 376 proteínas homólogas em apenas 4 foi verificada a alteração do aminoácido glicina e em nenhuma delas o resíduo mutante, ácido aspártico, está presente.

Neste caso só foi identificado esta alteração após terem sido sequenciados todos os exões e junções exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*. Este paciente teve um valor de C5OH ao rastreio de 13,2 µmol/L que é bastante elevado quando comparado com os valores de C5OH dos restantes pacientes com mutações *missense*. Apenas foi detectado mais um caso com valores de C5OH (14 µmol/L) semelhantes, mas neste caso a alteração identificada foi uma mutação *nonsense* em homozigotia no exão 1 do gene *MCCB* que origina uma proteína truncada (actividade nula).

Uma das possibilidades para este caso apresentar um valor bastante elevado de C5-OH é uma alteração localizada num “motivo” ESE (*Exonic Splicing Enhancer*). As ESE são sequências curtas nos exões que aumentam o reconhecimento do exão e onde se vão ligar as proteínas SR, família de proteínas importantes no *splicing*, quer por definir os exões quer por recrutar a maquinaria de *splicing* (spliceossoma) para junto das sequências consenso *splicing* intrónicas. Uma mutação numa ESE faria com que a maquinaria de *splicing* omitisse o exão, o que resultaria numa mutação *out-of-frame* (Stucki et al. 2009).

Stucki et al numa publicação recente demonstrou um mecanismo pelo qual uma mutação *missense* no exão 11 do gene *MCCB* localizada num “motivo” ESE, onde se liga a proteína SRp55, interfere parcialmente com a utilização desse ESE causando a utilização de um exão críptico (exão 10-A) no lugar do exão 11. Ou seja, uma mutação *missense* num ESE do exão 11 levou ao *skipping* desse exão e ao reconhecimento de um exão críptico no intrão 10. O caso estudado tinha um défice



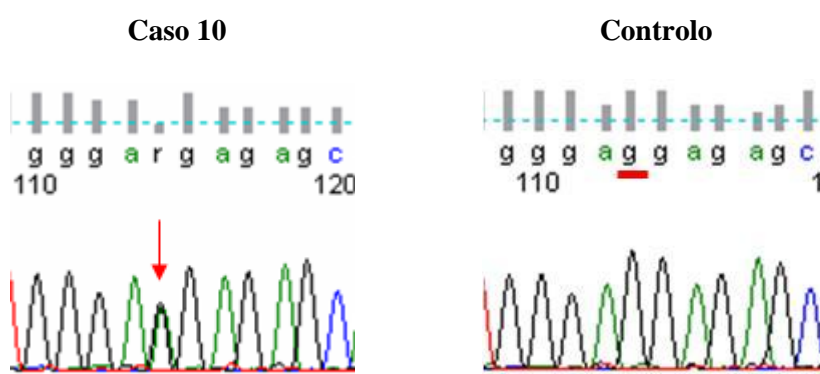
severo em 3-MCC e por estudos de expressão verificaram *MCCB* -exão 10 não produz *MCCB* detectável.

Outra possibilidade para este caso, é tratar-se de um hemizigótico onde apenas analisamos a mutação num dos alelos e o outro alelo possuir uma grande deleção/ inserção ou ser uma deleção completa desse alelo. Como neste caso não foram estudados os pais não podemos pôr de parte esta possibilidade e seria importante estudar neste caso a co-segregação desta mutação.

Perante análise da estrutura dos aminoácidos, alinhamento entre espécies e o resultado obtido pelo *Polyphen* pode-se considerar que a alteração p.G410D é possivelmente responsável pelo fenótipo bioquímico mas são necessários mais estudos nomeadamente no cDNA para verificarmos o efeito da mutação no mRNA.

### Mutação c.1423G>A

A mutação c.1423G>A que origina a substituição de um resíduo glicina, aminoácido apolar, por uma arginina, aminoácido polar básico, (p.G475R) foi identificada em heterozigotia no exão 15 no caso 10 (Figura 57). Esta mutação c.1423G>A foi identificada em heterozigotia com a mutação c.463C>T referida anteriormente, tratando-se portanto de um heterozigótico composto. Após sequenciação de todos os exões e junção exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, não foi identificada mais nenhuma alteração prevendo-se que estas alterações sejam responsáveis neste caso pelo fenótipo bioquímico.



**Figura 57- - Mutação c.1423G>A (caso 10).**

Representação parcial da sequência do caso 10, onde se evidencia a mutação c.1423G>A em heterozigotia, comparada com um controlo normal.

Como já referido anteriormente a estrutura dos aminoácidos glicina e arginina são tridimensionalmente diferentes. A glicina é um aminoácido hidrofóbico com uma estrutura simples ao contrário da arginina que é o aminoácido maior com carga positiva e com características

## Resultados e Discussão

hidrofílicas ou seja solúvel na água estando presente na superfície da proteína. Estas diferenças na estrutura dos aminoácidos envolvidos na substituição comprometem a conformação e logo a estabilidade da proteína.

O alinhamento entre espécies efectuado através do programa informático *Clustal W2* apresentado na Figura 58 mostra que a posição 475 é uma posição muito conservada entre as espécies analisadas, assim como a zona envolvente. Podemos então dizer que se trata de uma alteração com grande probabilidade ser patogénica uma vez todas as espécies usadas no alinhamento apresentam o mesmo aminoácido na referida posição.



Homo	IAKDGA	KMTVA	AVACA	QVPKIT	LIIGSS	YGAGNY	GMCGRA	YSPRFL	YIWPNA	RISVMG	GGEQ	477
Rattus	IAKDGA	KMTVA	AVSCA	KVPKIT	VIIGSS	YGAGNY	GMCGRA	YSPRFL	YMWPN	ARISVM	GGEQ	477
Mus	IAKDGA	KMTVA	AVACA	KVPKIT	VIIGSS	YGAGNY	GMCGRA	YSPRFL	YMWPN	ARISVM	GGEQ	477
Pan	IAKDGA	KMTVA	AVACA	QVPKIT	LIIGSS	YGAGNY	GMCGRA	YSPRFL	YIWPNA	RISVMG	GGEQ	477
Macaca	ITKDGA	KMTVA	AVACA	QVPKIT	LIIGSS	YGAGNY	GMCGRA	YSPRFL	YIWPNA	RISVMG	GGEQ	477
Danio	IAKDGA	KMTVA	AVACAN	VPKIT	VIIIGS	YGAGNY	GMCGRA	YGPRLF	YMWPN	SRISVM	GGEQ	480
Xenopus	IAKDGA	KMTVA	AVACAN	VPKIT	VIIIGS	YGAGNY	GMCGRA	YSPRFL	YMWPN	ARISVM	GGEQ	478

Figura 58- Alinhamento entre espécies de parte da sequência proteica do gene *MCCB*.

Seta especifica o local da ocorrência da substituição.

De acordo com a previsão obtida pelo *Polyphen* (Figura 59) esta alteração c.1423G>A, com uma diferença de *scores* relativamente ao alelo normal de 2.1, é considerada como provável patogénica.

Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
Q9HCC0	475	G	R	RecName: Full=Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial; Short=MCCase subunit beta; EC=6.4.1.4; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit; AltName: Full=3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2; Flags: Precursor; LENGTH: 563 AA
Prediction				
This variant is predicted to be probably damaging				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.199

Figura 59 - Previsão da patogenicidade da alteração c.1423G>A no gene *MCCB* através do programa *Polyphen*.

Este caso 10 trata-se de um paciente que no perfil de ácidos orgânicos apenas tem aumento de 3-HIVA não excretando na urina 3-MCG. Como esta mutação está presente juntamente com a

mutação p.R155W já descrita na literatura, como tendo actividade enzimática nula, é possível que esta nova alteração confira a enzima alguma actividade residual como já observado com outras mutações (p.V339M e p.S39F) descritas em pacientes que também não tem excreção do marcador patognomónico da doença.

Foi possível efectuar o estudo molecular aos pais que demonstraram ser portadores das mutações encontradas neste caso (Figura 60), a mãe é portadora da mutação c.463C>T já descrita e o pai é portador da alteração nova (c.1423G>A).

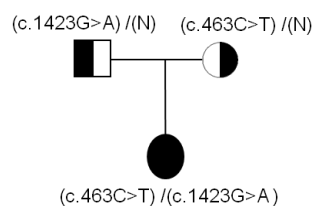


Figura 60 – Árvore genealógica do caso 10 onde foi encontrada a mutação causal

Perante todos estes resultados, análise da estrutura de aminoácidos, alinhamento de diferentes espécies, *Polyphen* e estudos de co-segregação pode-se considerar que esta alteração (associada à alteração c.463C>T) é provavelmente responsável pelo fenótipo bioquímico encontrado.

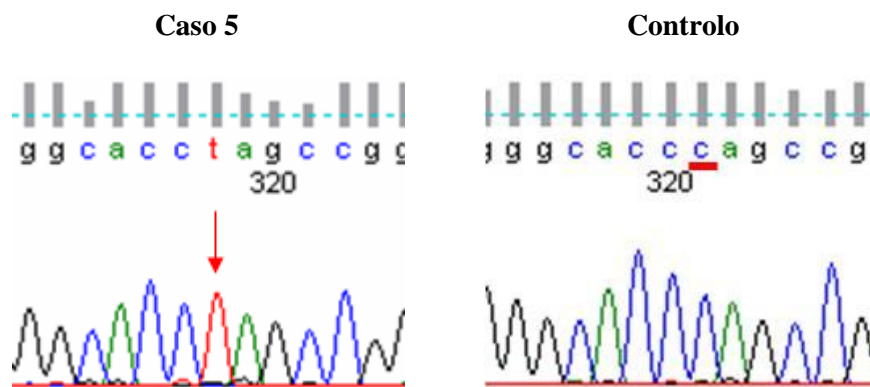
### 3.2. Mutações *nonsense*:

Foi detectada 1 mutação *nonsense*, não descrita na literatura, e que se encontra resumida na Tabela 10.

Tabela 10- Descrição da mutação *nonsense* encontrada.

Caso	Gene	Exão	Alteração cDNA	Efeito na proteína	Referencia
5	MCCB	1	c.100 C>T/ c.100 C>T	p.Q34X/ p.Q34X	Não descrita

A mutação c.100C>T que origina a substituição de uma glutamina por um codão de terminação prematuro (PTC) foi identificada no caso 5 em homozigotia no gene *MCCB* (Figura 61).



**Figura 61 - Mutação c.100C>T (caso 5).**

Representação parcial da sequência do caso 5, onde se evidencia a mutação c.100C>T em homozigotia, comparada com um controlo normal.

Uma vez que o domínio carboxiltransferase percorre quase toda a subunidade *MCCB*, proteínas truncadas neste domínio resultam na perda de função da subunidade da proteína (Figura 62).

Como o complexo activo MCC é composto por heterosubunidades (dodecamero  $(\alpha\beta)_6$ ) o excesso de produção de uma das subunidades pode levar a complexos incompletos, inactivos ou parcialmente activos.



**Figura 62 – Representação da alteração c.100C>T nos domínios da proteína.**

Este caso apresenta um valor bastante aumentado de C5-OH (14  $\mu\text{mol/L}$ ) no perfil de acilcarnitinas e no perfil de ácidos orgânicos aumento de 3-HIVA e 3-MCG. O fenótipo bioquímico descrito está de acordo com a alteração identificada uma vez que origina uma proteína truncada no resíduo 34 não funcional, levando a acumulação de 3-metilcrotonil-CoA na mitocôndria em quantidades suficientes para ocorrer a conjugação deste com a glicina (3-MCG).

Foi possível efectuar o estudo molecular aos pais que demonstraram ser portadores da mutação encontrada neste caso (Figura 63).

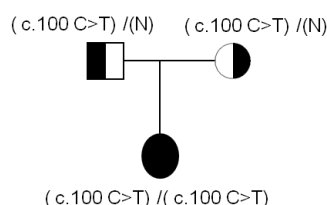


Figura 63 - Árvore genealógica do caso 5 onde foi encontrada a mutação causal.

A maioria dos transcritos que possuem PTC são reconhecidos e degradados pela célula através da via *nonsense mediated mRNA decay* (NMD). Este mecanismo de vigilância protege o organismo de efeitos potencialmente nocivos causados por alterações na expressão de genes que resultam na terminação prematura da tradução (Frischmeyer and Dietz 1999). É importante para as células eliminarem os mRNAs que terminam prematuramente a tradução uma vez que originam proteínas truncadas não funcionais ou proteínas que adquirirem efeitos dominantes negativos ou ganho de função (Isken and Maquat 2007).

### 3.3. Mutações de alteração da grelha de leitura (*frameshift*) - pequenas deleções ou pequenas inserções

A Tabela 11 resume as mutações encontradas neste estudo correspondentes a pequenas deleções ou pequenas inserções, que originam alteração da grelha de leitura levando a uma proteína truncada prematuramente.

Tabela 11- Descrição das mutações de *frameshift* encontradas.

Caso	Gene	Exão	Alteração cDNA	Efeito na proteína	Referencia
3	MCCA	9	c.924_925delAG/N	p.R308_309SfsX2/N	Não descrita
11	MCCB	17	c.1635_1636insT	p.S546X	Não descrita
17	MCCB	6	c.517_518insT	p.S173FfsX25	(Baumgartner et al. 2001)
20	MCCA	2	c.97_98delT/N	p.V33G fsX6/N	Não descrita

#### 3.3.1. Mutações *frameshift* descritas na literatura

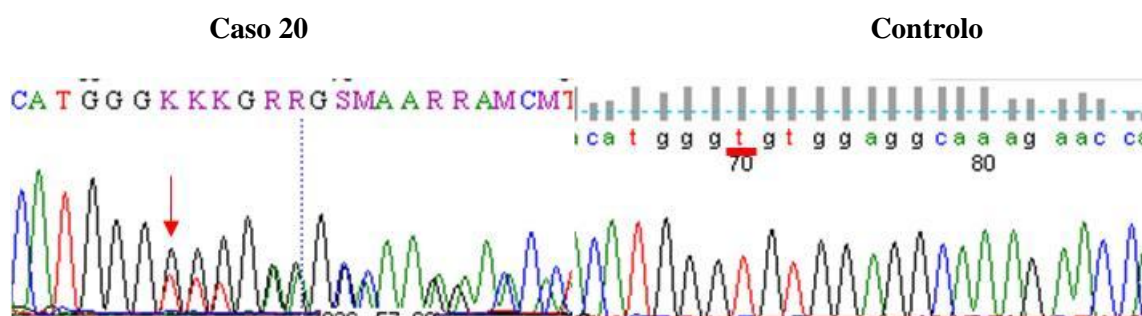
A mutação *frameshift* descrita na literatura identificada neste estudo foi uma inserção no exão 6, c.517\_518insT, no caso 17. Esta alteração encontra-se em heterozigotia com outra alteração já descrita na literatura e mencionada anteriormente. Este caso refere-se a um paciente de origem

espanhola com atraso de desenvolvimento psicomotor, sendo o único caso sintomático neste estudo uma vez que todos os outros são RN detectados no rastreio neonatal no nosso país.

### 3.3.2. Mutações *frameshift* não descritas na literatura

#### c.97\_98delT

No caso 20 foi detectada uma deleção de uma timina no exão 2 (c.97\_98delT) do gene *MCCA* em heterozigotia como mostra a Figura 64. Esta pequena deleção causa uma mutação *frameshift* alterando o aminoácido na sequência e introduzindo um PTC na grelha de leitura da proteína alterada 6 aminoácidos a jusante da mutação, originando uma proteína truncada com 39 aminoácidos (p.V33G fsX6).



**Figura 64 - Mutação c.97\_98delT (caso 20).**

Representação parcial da sequência do caso 20, onde se evidencia a mutação c.97\_98delT em heterozigotia, comparada com um controlo normal.

Esta mutação localiza-se na região N-terminal da enzima (Figura 65), zona esta que possui sequências específicas, sinais *target* mitocondrias, que a vão enviar para a matriz mitocondrial onde são reconhecidas por receptores presentes na membrana mitocondrial. Os sinais *target* mitocondriais do *MCCA* estão localizados 39 aminoácidos após o resíduo de iniciação metionina dentro da região amino-terminal (exão 1 e exão 2), sendo esta a região necessária e suficiente para dirigir *MCCA* para a mitocôndria.

Esta proteína vai ter actividade enzimática nula uma vez que é truncada e faltam domínios funcionalmente importantes tais como locais de ligação do bicarbonato e de biotina. Por possuir um PTC estes mRNAs são bastante instáveis e vão ser rapidamente degradados pelo NMD evitando a acumulação de mRNAs aberrantes que podem produzir peptídeos truncados tóxicos para a célula (Wen and Brogna 2008).



**Figura 65 - Representação da alteração c.97\_98delT nos domínios da proteína**

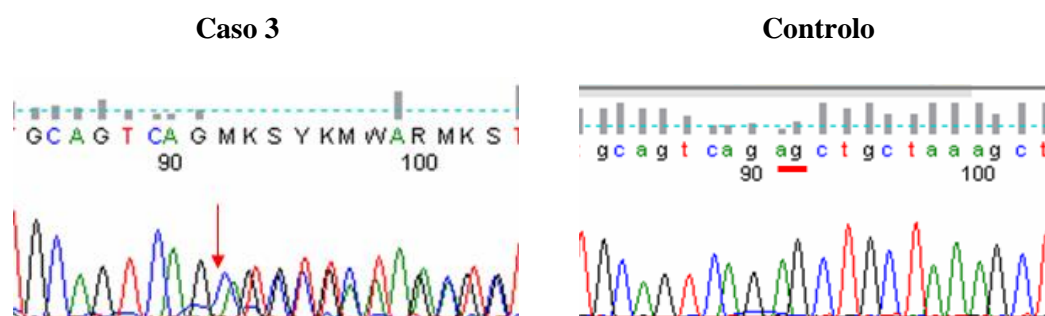
Neste caso, após sequenciação de todos os exões e junções exão-intrão dos genes *MCCA* e *MCCB*, não foi identificada mais nenhuma alteração podendo a alteração do outro alelo estar no promotor ou tratar-se de uma grande deleção ou inserção. Nestas situações ao estudarmos o DNA genómico apenas estamos a sequenciar um alelo como constatado por Dantas (Dantas et al. 2005) num estudo efectuado a 28 indivíduos.

Outra possibilidade, e dado o valor de C5-OH não ser muito elevado, é podermos estar perante um portador desta deleção que por resultar numa proteína truncada acumula alguma 3-metilcrotonil-CoA na mitocôndria que é metabolizada em C5-OH sem ocorrer a conjugação da 3-metilcrotonil-CoA com a glicina, devido provavelmente à quantidade de 3-metilcrotonil-CoA acumulada ser baixa por ser compensada pelo alelo normal.

Foi efectuado o estudo molecular à mãe que demonstra ser normal para esta alteração.

### **c.924\_925delAG**

No caso 3 identificou-se uma deleção do dinucleótido AG no exão 9 do gene *MCCA* em heterozigotia como evidência a Figura 66. Prevê-se que esta alteração altere a grelha de leitura e origine um PTC 2 aminoácidos após a mutação, originando uma proteína truncada (p.Arg308\_309Ser fsX2).



**Figura 66 - Mutação c.924\_925delAG (caso 3).**

Representação parcial da sequência do caso 3, onde se evidencia a mutação c.924\_925delAG em heterozigotia, comparada com um controlo normal.



Esta deleção causa uma mutação *frameshift* alterando o aminoácido arginina na sequência proteica e introduzindo um PTC na grelha de leitura da proteína alterada 2 aminoácidos após a deleção.

Esta alteração no exão 9 localiza-se no domínio biotina carboxilase, como podemos verificar na Figura 67, e um PTC neste domínio resulta numa perda de função desta subunidade proteica uma vez que perde domínios importantes tais como locais de ligação bicarbonato e biotina.



Figura 67 - Representação da alteração c.924\_925delAG nos domínios da proteína.

Como já referido anteriormente, esta alteração origina um PTC e, como os mRNA contendo PTC são bastante instáveis, são rapidamente degradados pelo NMD e os poucos mRNAs que conseguem escapar a esta via NMD resultam provavelmente em proteínas truncadas que são degradadas por proteases intracelulares.

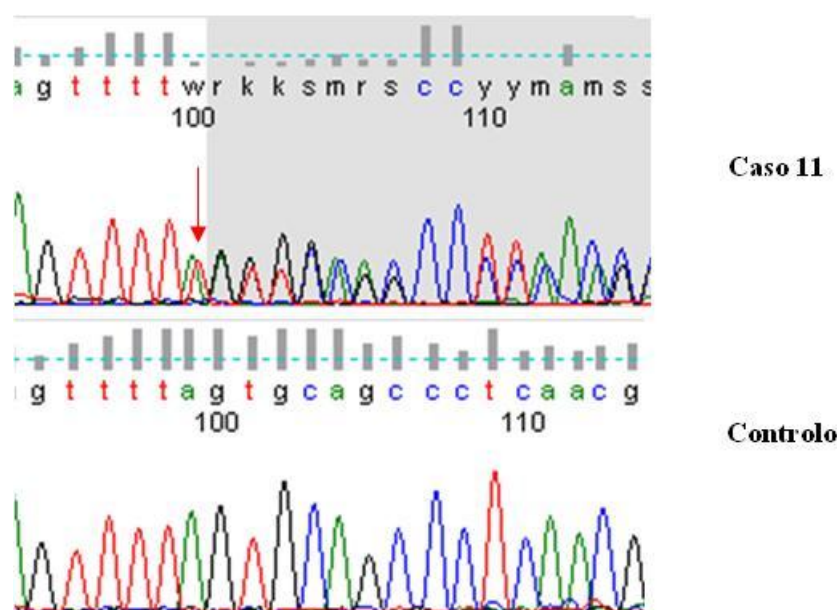
Neste caso também foram sequenciados todos os exões e junções intrão-exão de ambos os genes não tendo sido encontrada mais nenhuma alteração e tal como vimos anteriormente a alteração do outro alelo pode estar no promotor ou tratar-se de uma grande deleção ou inserção. Tratando-se de uma grande deleção/inserção ou mutação no promotor seria de esperar um fenótipo bioquímico mais severo, ou seja, um valor de C5-OH mais elevado o que não é o caso (1,3  $\mu\text{mol/L}$ ). Perante este valor de C5-OH é provável, como já referido para a alteração c.97\_98delT, que estejamos perante um portador da mutação que manifesta o fenótipo bioquímico provavelmente devido à alteração identificada possuir um efeito deletério que não é compensado na totalidade pelo alelo normal.

Foi efectuado o estudo molecular à mãe que demonstra ser normal para esta alteração.

### c.1635\_1636insT

No caso 11 identificou-se uma inserção de um nucleótido timina no exão 17 do gene *MCCB* em heterozigotia como podemos visualizar na (Figura 68). Esta alteração encontra-se em heterozigotia com outra mutação já descrita na literatura e mencionada anteriormente c.1015G>A.





**Figura 68 - Mutação c.1635\_1636insT (caso 11).**

Representação parcial da sequência do caso 11, onde se evidencia a mutação c.1635\_1636insT em heterozigotia, comparada com um controlo normal.

Esta inserção provoca a substituição do aminoácido serina por um PTC no resíduo 546 (p.Ser546X), originando uma proteína truncada.

Como o codão de terminação se encontra no resíduo 546 de uma proteína com 563 resíduos, localiza-se no último exão, é provável que nesta situação como se encontra próximo do fim 3' (Figura 69) o NMD não seja activado, uma vez que os codões de terminação activam o NMD quando localizados a montante do último intrão (Wen and Brogna 2008; Stucki et al. 2009).



**Figura 69 - Representação da alteração c.1635\_1636insT nos domínios da proteína**

Como referido anteriormente esta mutação encontra-se associada a outra mutação, p.V339M já descrita na literatura, cuja enzima resultante possui actividade residual. Neste caso o paciente apresenta aumento de C5-OH (2.4  $\mu\text{mol/L}$ ) no perfil de acilcarnitinas e no perfil de ácidos orgânicos não excreta o marcador patognomónico, 3-MCG, que esta de acordo com as alterações identificadas uma vez que a alteração c.1635\_1636insT se encontra no final da cadeia polipeptídica

e a p.V339M está associada aos não excretadores do marcador patognomónico. Foi efectuado o estudo molecular à mãe que mostrou ser portadora desta nova alteração.

### 3.4. Mutações de *splicing*

Foi detectada 1 mutação *splicing* não descrita na literatura, e que se encontra resumida na Tabela 12.

Tabela 12 - Descrição da mutação *splicing* encontrada.

Caso	Gene	Exão	Alteração cDNA	Efeito na proteína	Referencia
19	MCCB	13	c.1216 +2T>C	?	Não descrita

#### c.1216 +2T>C

No caso 19 foi detectada por sequenciação genómica a alteração c.1216 +2T>C no intrão 13 em heterozigotia, situada num local de consenso de *splicing* (5' local dador de *splicing*) (Figura 70).

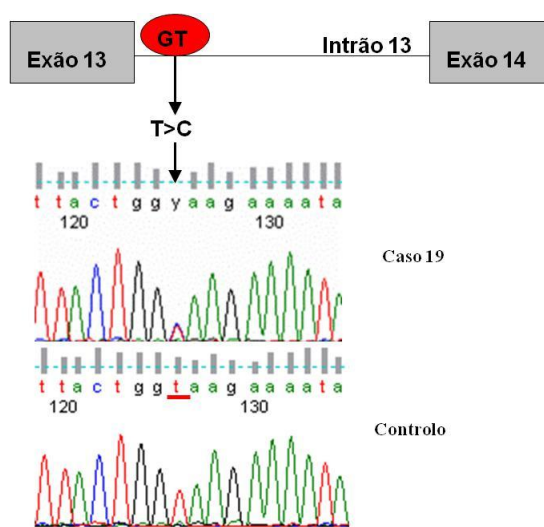


Figura 70 – Mutação c.1216 +2T>C (caso 19).

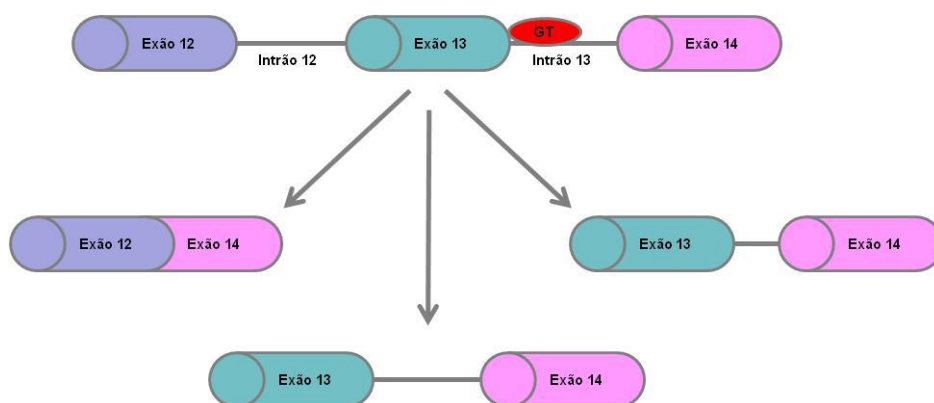
Figura representativa do local consenso de *splicing* afectado pela mutação c.1216 +2T>C no intrão 13, juntamente com representação parcial da sequenciação do gDNA do caso 19.

Durante o processo de *splicing* os intrões são removidos com elevada especificidade. Existem “motivos” conservados junto das junções intrão-exão (local de *splicing* 3'e 5') que actuam como sinais para ocorrer a correcta identificação e junção dos exões. Na maioria dos casos, o local consenso de *splicing* em 5'(dador) tem o motivo guanina/timina (GT; guanina/uracilo (GU) no

mRNA), em 3' (aceitador) tem o motivo adenina/guanina (AG) (Desviat L.R. et al. 2007). Para além destes “motivos” nas junções intrão-exão existem outros elementos regulatórios (*splicing enhancers* ou *silencers*) localizados nos exões ou intrões que permitem o processo normal de *splicing*.

Utilizou-se o software *Human Splicing Analyser* v.2.3 (<http://www.umd.be/HSF/>) para efectuar a previsão do *score* para este local de *splicing* e verificou-se que a presença da mutação diminui o *score* de 92,9 associado ao local na sequência de referência para 66,08 na sequência mutada, com perda do local dador de *splicing*. A previsão do software indica uma redução de 28,88% no *score* deste local de *splicing*. A perda de utilização deste local de *splicing* pode resultar no *skipping* do exão 13 ou ocorrer uma retenção total ou parcial do intrão 13 por reconhecimento de um outro local de *splicing* (sequência consenso GT).

Neste caso é importante o estudo do mRNA para verificar qual o efeito desta mutação na proteína, se ocorre o *skipping* do exão ou se, por outro lado, ocorre retenção total ou parcial do intrão (Figura 71).



**Figura 71 – Esquema representativo das várias possibilidades de efeito da mutação c.1216 +2T>C na proteína.**

Esta alteração encontra-se em heterozigotia com outra mutação já mencionada, p.I200N, numa mãe assintomática, detectada através do rastreio neonatal do seu filho. Esta mãe, em termos bioquímicos, não apresenta valores muito elevados de C5-OH (2.9  $\mu\text{mol/L}$ ), talvez por apresentar no outro alelo a mutação p.I200N, que de acordo com a previsão, é classificada como sendo benigna e pode portanto compensar o efeito da mutação c.1216 +2T>C na proteína. Foi efectuada o estudo molecular ao filho que mostrou ser portador desta nova alteração e normal para a mutação p.I200N excluindo assim a possibilidade de ter herdado as duas alterações do mesmo alelo.

### 3.5. Casos negativos

Foram ainda estudados dois casos maternos que apresentavam aumento de C5-OH no perfil de acilcarnitinas, que foram estudados por os seus filhos apresentarem aumento de C5-OH no rastreio neonatal e posterior normalização na amostra de confirmação.

Foram sequenciados todos os exões e junções intrão-exão de ambos os genes *MCCA* e *MCCB*, não tendo sido identificada nenhuma alteração. Este aumento de C5-OH em ambas as mães pode estar relacionado com défices vitamínicos, neste caso de biotina que compromete a actividade das enzimas biotina dependentes. Mock (Mock 2009) num artigo publicado recentemente fornece evidências de que uma proporção considerável de mulheres grávidas possui deficiências em biotina. Nos estudos da deficiência marginal de biotina induzida experimentalmente em adultos, o aumento da excreção urinária de ácido 3-HIVA, que provavelmente reflecte uma diminuição da actividade das enzimas biotina-dependentes, foi validado como indicador do estado biotina. Cerca de metade das mulheres grávidas excretam quantidades aumentadas de 3-HIVA na urina.

Nestes dois casos o valor de C5-OH no perfil de acilcarnitinas encontrava-se ligeiramente aumentado (aproximadamente 1). No caso 15 o perfil de ácidos orgânicos demonstrou um ligeiro aumento de 3-HIVA sem excreção de 3-MCG, o que pode estar de acordo com Mock, onde este descreve as deficiências em biotina nas mulheres grávidas e a excreção de 3-HIVA na urina. No caso 16 foi efectuado o estudo da biotinidade que demonstrou um défice parcial (aguarda confirmação). Este défice parcial pode justificar o aumento do C5-OH observado no perfil de acilcarnitinas, uma vez que a reciclagem da biotina não está a ser efectuada na totalidade, o que pode comprometer as enzimas dependentes de biotina.

## Conclusão e Perspectivas Futuras

---



## 4. CONCLUSÃO

O estudo apresentado nesta dissertação pretende estabelecer um diagnóstico etiológico em doentes com MCG detectados pelo Programa Nacional de Diagnóstico Precoce.

De modo a estabelecer este diagnóstico foi utilizada uma amostra de 20 doentes com MCG, na qual foram analisados 19 exões no gene *MCCA* e 17 exões no gene *MCCB* para tentar identificar e caracterizar as mutações mais frequentes na nossa população.

A análise dos resultados obtidos permitem constatar que a maioria dos casos estudados são heterozigóticos compostos, sendo apenas 4/20 homozigóticos, o que aumenta a diversidade genotípica desta patologia.

Em cinco casos permanece por identificar a mutação no segundo alelo, depois de terem sido sequenciados todos os exões e junções exões-intrões de ambos os genes, o que pode ocorrer se estivermos perante uma grande deleção ou inserção, ou por se tratar de uma mutação no promotor. Analisando especificamente cada uma destas cinco situações podemos tirar as seguintes conclusões:

- Como a alteração p.E383K no gene *MCCA* se localiza numa região próxima da alteração p.R385S e está apresenta um efeito dominante negativo sobre o alelo normal, é de supor que esta nova alteração possa exercer o mesmo efeito dominante negativo sobre o alelo normal (uma vez que substitui um aminoácido com carga ácida por um com carga básica na mesma região).
- No caso materno 13, onde apenas foi identificada a mutação descrita p.V339M em heterozigotia, poderá tratar-se apenas de uma portadora da doença que manifestou o fenótipo bioquímico devido à situação de stress metabólico provocado pelo parto.
- Nas duas deleções encontradas apenas em heterozigotia (casos 3 e 20) podem tratar-se apenas de portadoras da patologia e que manifestam o fenótipo bioquímico porque um dos alelos origina proteínas truncadas. O valor de C5-OH nestes casos é baixo relativamente aos restantes valores de C5-OH; se estes casos possuísem uma grande deleção/inserção ou mutações no promotor seria de esperar a ocorrência de valores de C5-OH mais elevados porque à partida originariam proteínas truncadas, ou seja, com actividade nula.
- No caso 6 o polimorfismo p.G214A identificado em conjunto com a mutação nova p.N230D poderá ser responsável pelo fenótipo bioquímico encontrado.

Nas 26 mutações detectadas foram identificadas 1 mutação *nonsense*, 4 mutações *frameshift* (pequenas deleções e pequenas inserções), 20 mutações *missense* e 1 mutação de *splicing*. Destas,

16 não se encontram ainda descritas na literatura nem na base de dados *HGMD*®, o que corresponde a uma percentagem de novas mutações de 61.5%.

Nas mutações não descritas na literatura *nonsense*, *splicing* ou *frameshift* geralmente assume-se a sua patogenicidade por prever que resultem em proteínas truncadas ou seja com actividade nula.

O mesmo não acontece com as mutações *missense* onde o efeito molecular na função, estrutura ou estabilidade da proteína é difícil de prever e onde são necessários estudos funcionais dessas mutações para provar que são responsáveis pela deficiência em 3-MCC. No entanto, as 10 mutações *missense* identificadas não descritas na literatura foram avaliadas e consideradas como prováveis mutações patogénicas devido aos seguintes factores: não foram identificadas outras mutações após sequenciar ambos os genes *MCCA* e *MCCB*; as mutações identificadas foram confirmadas por dois PCR independentes; as mutações identificadas segregam um fenótipo bioquímico; em duas das mutações p.G68V e p.N230D foram efectuados estudos populacionais em 100 indivíduos controlo; nos casos 1, 5 e 10 foi efectuado o estudo aos pais onde se verificou que ambos segregavam as mutações encontradas; todas, excepto p.G105R, p.N230D e p.I200N, afectam resíduos altamente conservados sugerindo que elas são importantes para função 3-MCC; nas mutações p.G105R, p.N230D e p.I200N, o resíduo mutante nunca está presente nas proteínas homólogas analisadas.

Todos os casos portadores da alteração p.V339M, eram não excretadores de 3-MCG. Das mutações descritas esta revelou ser a mais frequente nos casos estudados (foi detectada em 5 dos casos).

Uma vez que a alteração p.G475R foi identificada em conjunto com a alteração p.R155W num caso sem excreção de 3-MCG, sendo que a alteração p.R155W já se encontra descrita e é considerada como tendo actividade nula, é de supor que esta nova alteração possua actividade residual como verificado para as mutações p.V339M e p.S39F.

A análise mutacional dos genes *MCCA* e *MCCB* revelou-se importante nas seguintes situações: quando o marcador patognomónico da doença 3-MCG está ausente; nos doentes com a mutação R385S, atendendo a que esta mutação está descrita como respondendo a doses de biotina; e nos casos em que possuem actividade enzimática residual, que fora de um quadro de descompensação metabólica apresentam excreção normal de ácidos orgânicos.

O paciente sintomático é portador de uma mutação que confere aproximadamente 4% de actividade residual da enzima e de outra que origina uma proteína truncada o que justifica o fenótipo clínico. Este doente reforça a importância da inclusão desta patologia no painel de doenças rastreadas no Programa Nacional de Diagnóstico Precoce.



Em conclusão, o estudo molecular pode não predizer o fenótipo ou o risco metabólico destes casos, mas permite confirmar o diagnóstico nos casos duvidosos. A deficiência em 3-MCC ainda é uma entidade não completamente conhecida e a sua apresentação clínica é bastante heterogénea, apresentado a maioria dos doentes mutações próprias não sendo visível uma correlação genótipo / fenótipo. A continuação deste estudo é necessária para encontrar marcadores genéticos e/ou bioquímicos que expliquem a razão pela qual um número relativamente reduzido de indivíduos apresenta risco de desenvolver um fenótipo severo da doença.

### 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

De forma a completar o estudo seria interessante estudar os mRNAs nos cinco casos em que só se encontrou uma alteração num alelo, de modo a verificar se as pequenas quantidades de mRNA formadas são provocadas por uma grande deleção/inserção ou mutação no promotor.

Seria interessante estudar os mRNAs dos casos índice, uma vez que se estima que 15% de mutações *missense* podem originar alterações sobre o correcto *splicing* de muitos genes tendo implicações sobre o fenótipo resultante nos doentes.

Uma vez que existem genes modificadores capazes de alterar o fenótipo da doença, seria importante estudar o gene HCS para verificar se existem polimorfismos associados que possam potenciar o fenótipo ou pelo contrário compensar, evitando o desenvolvimento do fenótipo.

Nos casos em que a mutação R385S se encontra em heterozigotia, a quantificação do transcrito mutado *versus* transcrito normal teria todo o interesse para prever o fenótipo observado, uma vez que a existência de diferentes fenótipos perante este genótipo pode ser explicada pela quantidade de transcrito normal formado *versus* transcrito mutado.

Efectuar os restantes estudos populacionais nas alterações *missense* não descritas na literatura, assim como do polimorfismo p.G214A na nossa população.

Nos casos em que não se verificou excreção de 3-MCG, estudar a actividade da aciltransferase responsável pela conversão da 3-metilcrotonil-CoA em 3-MCG seria essencial, uma vez que esta enzima pode ser responsável pela ausência do marcador patognomónico da doença na urina.

A realização de estudos de quantificação dos níveis de mRNA destes pacientes por PCR em tempo real, podia contribuir para um possível estabelecimento correlação genótipo/fenótipo.

Seria ainda importante efectuar os restantes estudos de segregação para confirmar se ambos os pais segregam as mutações.

## **Bibliografia**

---



## 6. BIBLIOGRAFIA

Arnold, G. L., D. D. Koeberl, D. Matern, B. Barshop, N. Braverman, B. Burton, S. Cederbaum, A. Fiegenbaum, C. Garganta, J. Gibson, S. I. Goodman, C. Harding, S. Kahler, D. Kronn and N. Longo (2008). A Delphi-based consensus clinical practice protocol for the diagnosis and management of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*, 93(4): 363-70.

Baumgartner, M. (2005). 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *orphanet encyclopedia* <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-MCC.pdf>.

Baumgartner, M. R. (2005). Molecular mechanism of dominant expression in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 28(3): 301-9.

Baumgartner, M. R., S. Almashanu, T. Suormala, C. Obie, R. N. Cole, S. Packman, E. R. Baumgartner and D. Valle (2001). The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest*, 107(4): 495-504.

Baumgartner, M. R., M. F. Dantas, T. Suormala, S. Almashanu, C. Giunta, D. Friebe, B. Gebhardt, B. Fowler, G. F. Hoffmann, E. R. Baumgartner and D. Valle (2004). Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: evidence for an allele-specific dominant negative effect and responsiveness to biotin therapy. *Am J Hum Genet*, 75(5): 790-800.

Baykal, T., G. H. Gokcay, Z. Ince, M. F. Dantas, B. Fowler, M. R. Baumgartner, F. Demir, G. Can and M. Demirkol (2005). Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: early-onset necrotizing encephalopathy with lethal outcome. *J Inherit Metab Dis*, 28(2): 229-33.

Bixel, M. G. and B. Hamprecht (2000). Immunocytochemical localization of beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase in astroglial cells and neurons in culture. *J Neurochem*, 74(3): 1059-67.

Blau, N., M. Duran and K. M. Gibson (2008). Laboratory guide to the methods in biochemical genetics. New York, Springer.

Bonafe, L., H. Troxler, T. Kuster, C. W. Heizmann, N. A. Chamois, A. B. Burlina and N. Blau (2000). Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias. *Mol Genet Metab*, 69(4): 302-11.

- Boneh, A., M. Baumgartner, M. Hayman and H. Peters (2005). Methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) deficiency associated with severe muscle pain and physical disability in an adult. *J Inherit Metab Dis*, 28(6): 1139-40.
- Carmen R. Vargas, M. W. (2001). Acidúrias orgânicas: diagnóstico e tratamento. *Revista AMRIGS*, 4(1,2): 77-82.
- Chu, C. H. and D. Cheng (2007). Expression, purification, characterization of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCCC). *Protein Expr Purif*, 53(2): 421-7.
- Dantas, M. F., T. Suormala, A. Randolph, D. Coelho, B. Fowler, D. Valle and M. R. Baumgartner (2005). 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Hum Mutat*, 26(2): 164.
- de Kremer, R. D., A. Latini, T. Suormala, E. R. Baumgartner, L. Larovere, G. Civallero, N. Guelbert, A. Paschini-Capra, C. Depetris-Boldini and C. Q. Mayor (2002). Leukodystrophy and CSF purine abnormalities associated with isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Metab Brain Dis*, 17(1): 13-8.
- den Dunnen, J. T. and S. E. Antonarakis (2001). Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*, 109(1): 121-4.
- Desmet, F. O., D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Beroud, M. Claustres and C. Beroud (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*, 37(9): e67.
- Desviat L.R., Pérez B. and Ugarte M. (2007). Functional analysis of splicing mutations causing organic acidemias. *Current Research on Organic Acidemias*, (6): 17-19.
- Desviat, L. R., C. Perez-Cerda, B. Perez, J. Esparza-Gordillo, P. Rodriguez-Pombo, M. A. Penalva, S. Rodriguez De Cordoba and M. Ugarte (2003). Functional analysis of MCCA and MCCB mutations causing methylcrotonylglycinuria. *Mol Genet Metab*, 80(3): 315-20.
- Dirik, E., U. Yis, G. Pasaoglu, C. Chambaz and M. R. Baumgartner (2008). Recurrent attacks of status epilepticus as predominant symptom in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Brain Dev*, 30(3): 218-20.
- Dupuis, L., E. Campeau, D. Leclerc and R. A. Gravel (1999). Mechanism of biotin responsiveness in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*, 66(2): 80-90.

- Eldjarn, L., E. Jellum, O. Stokke, H. Pande and P. E. Waaler (1970). Beta-hydroxyisovaleric aciduria and beta-methylcrotonylglycinuria: a new inborn error of metabolism. *Lancet*, 2(7671): 521-2.
- Eminoglu, F. T., A. A. Ozcelik, I. Okur, L. Tumer, G. Biberoglu, E. Demir, A. Hasanoglu and M. R. Baumgartner (2009). 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: phenotypic variability in a family. *J Child Neurol*, 24(4): 478-81.
- Ficicioglu, C. and I. Payan (2006). 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: metabolic decompensation in a noncompliant child detected through newborn screening. *Pediatrics*, 118(6): 2555-6.
- Frazier, D. M., D. S. Millington, S. E. McCandless, D. D. Koeberl, S. D. Weavil, S. H. Chaing and J. Muenzer (2006). The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inherit Metab Dis*, 29(1): 76-85.
- Friebel, D., M. von der Hagen, E. R. Baumgartner, B. Fowler, G. Hahn, P. Feyh, G. Heubner, M. R. Baumgartner and G. F. Hoffmann (2006). The first case of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) deficiency responsive to biotin. *Neuropediatrics*, 37(2): 72-8.
- Frischmeyer, P. A. and H. C. Dietz (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*, 8(10): 1893-900.
- Gallardo, M. E., L. R. Desviat, J. M. Rodriguez, J. Esparza-Gordillo, C. Perez-Cerda, B. Perez, P. Rodriguez-Pombo, O. Criado, R. Sanz, D. H. Morton, K. M. Gibson, T. P. Le, A. Ribes, S. R. de Cordoba, M. Ugarte and M. A. Penalva (2001). The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism. *Am J Hum Genet*, 68(2): 334-46.
- Gibson, K. M., M. J. Bennett, E. W. Naylor and D. H. Morton (1998). 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children. *J Pediatr*, 132(3 Pt 1): 519-23.
- Gravel, R. A. and M. A. Narang (2005). Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. *J Nutr Biochem*, 16(7): 428-31.
- Han, L. S., J. Ye, W. J. Qiu, X. L. Gao, Y. Wang and X. F. Gu (2007). Selective screening for inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in China: a four-year report. *J Inherit Metab Dis*, 30(4): 507-14.

- Hoffmann, G. F., R. von Kries, D. Klose, M. Lindner, A. Schulze, A. C. Muntau, W. Roschinger, B. Liebl, E. Mayatepek and A. A. Roscher (2004). Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr*, 163(2): 76-80.
- Holzinger, A., W. Roschinger, F. Lagler, P. U. Mayerhofer, P. Lichtner, T. Kattenfeld, L. P. Thuy, W. L. Nyhan, H. G. Koch, A. C. Muntau and A. A. Roscher (2001). Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA: carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet*, 10(12): 1299-306.
- Isken, O. and L. E. Maquat (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev*, 21(15): 1833-56.
- Koeberl, D. D., D. S. Millington, W. E. Smith, S. D. Weavil, J. Muenzer, S. E. McCandless, P. S. Kishnani, M. T. McDonald, S. Chaing, A. Boney, E. Moore and D. M. Frazier (2003). Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *J Inherit Metab Dis*, 26(1): 25-35.
- Leon-Del-Rio, A. (2005). Biotin-dependent regulation of gene expression in human cells. *J Nutr Biochem*, 16(7): 432-4.
- Leonard, J. V., J. W. Seakins, K. Bartlett, J. Hyde, J. Wilson and B. Clayton (1981). Inherited disorders of 3-methylcrotonyl CoA carboxylation. *Arch Dis Child*, 56(1): 53-9.
- Lynne A. Wolfe, M., CRNP<sup>a,b</sup>, David N. Finegold, MD<sup>a,b,c,d</sup>, Jerry Vockley, MD, PhD<sup>a,b,c</sup>, Nicole Walters, RD, LDN<sup>a,b</sup>, Celine Chambaz, BSc, Terttu Suormala, PhD<sup>f</sup>, Hans Georg Koch, MD<sup>g</sup>, Dietrich Matern, MD<sup>h</sup>, Bruce A. Barshop, MD, PhD<sup>i</sup>, Lorna J. Cropchod<sup>j</sup>, Matthias R. Baumgartner, MDe and K. Michael Gibson, PhD<sup>a,b,c,d,j</sup> (2007). Potential Misdiagnosis of 3-Methylcrotonyl-Coenzyme A Carboxylase Deficiency Associated With Absent or Trace Urinary 3-Methylcrotonylglycine. *Pediatrics*, 120(No. 5): pp. e1335-e1340.
- Matthews, D. E. (2005). Observations of branched-chain amino acid administration in humans. *J Nutr*, 135(6 Suppl): 1580S-4S.
- McKean, A. L., J. Ke, J. Song, P. Che, S. Achenbach, B. J. Nikolau and E. S. Wurtele (2000). Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 275(8): 5582-90.
- McMahon, R. J. (2002). Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu Rev Nutr*, 22: 221-39.



- Mock, D. M. (2009). Marginal biotin deficiency is common in normal human pregnancy and is highly teratogenic in mice. *J Nutr*, 139(1): 154-7.
- Murayama, K., M. Kimura, S. Yamaguchi, T. Shinka and K. Kodama (1997). Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 15-year-old girl. *Brain Dev*, 19(4): 303-5.
- Murin, R., S. Verleysdonk, M. Rapp and B. Hamprecht (2006). Immunocytochemical localization of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase in cultured ependymal, microglial and oligodendroglial cells. *J Neurochem*, 97(5): 1393-402.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2004). Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman. 75-111.
- Obata, K., T. Fukuda, R. Morishita, S. Abe, S. Asakawa, S. Yamaguchi, M. Yoshino, K. Ihara, K. Murayama, K. Shigemoto, N. Shimizu and I. Kondo (2001). Human biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase gene (MCCA): cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal band 3q27, and expression. *Genomics*, 72(2): 145-52.
- Oude Luttikhuis, H. G., G. Touati, D. Rabier, M. Williams, C. Jakobs and J. M. Saudubray (2005). Severe hypoglycaemia in isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency; a rare, severe clinical presentation. *J Inherit Metab Dis*, 28(6): 1136-8.
- Pacheco-Alvarez, D., R. S. Solorzano-Vargas and A. L. Del Rio (2002). Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res*, 33(5): 439-47.
- Pasquali, M., G. Monsen, L. Richardson, M. Alston and N. Longo (2006). Biochemical findings in common inborn errors of metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 142C(2): 64-76.
- Pearson, M. A., K. A. Aleck and R. A. Heidenreich (1995). Benign clinical presentation of 3-methylcrotonylglycinuria. *J Inherit Metab Dis*, 18(5): 640-1.
- Peters, V., S. F. Garbade, C. D. Langhans, G. F. Hoffmann, R. J. Pollitt, M. Downing and J. R. Bonham (2008). Qualitative urinary organic acid analysis: methodological approaches and performance. *J Inherit Metab Dis*, 31(6): 690-6.
- Pinto, L., P. Zen, R. Rosa, G. Paskulin, A. Perla, L. Barea, M. R. Baumgartner, M. F. Dantas, B. Fowler, R. Giugliani, C. Vargas, M. Wajner and C. Graziadio (2006). Isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in a child with metabolic stroke. *J Inherit Metab Dis*, 29(1): 205-6.

Rashed, M. S., P. T. Ozand, M. P. Bucknall and D. Little (1995). Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res*, 38(3): 324-31.

Rodriguez-Melendez, R. and J. Zemleni (2003). Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem*, 14(12): 680-90.

Rolland, M. O., P. Divry, M. T. Zabot, P. Guibaud, S. Gomez, A. Lachaux and I. Loras (1991). Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 16-month-old child. *J Inherit Metab Dis*, 14(5): 838-9.

Roschinger, W., D. S. Millington, D. A. Gage, Z. H. Huang, T. Iwamoto, S. Yano, S. Packman, K. Johnston, S. A. Berry and L. Sweetman (1995). 3-Hydroxyisovalerylcarnitine in patients with deficiency of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase. *Clin Chim Acta*, 240(1): 35-51.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463-7.

Sloane, V. and G. L. Waldrop (2004). Kinetic characterization of mutations found in propionic acidemia and methylcrotonylglycinuria: evidence for cooperativity in biotin carboxylase. *J Biol Chem*, 279(16): 15772-8.

Stadler, S. C., R. Polanetz, E. M. Maier, S. C. Heidenreich, B. Niederer, P. U. Mayerhofer, F. Lagler, H. G. Koch, R. Santer, J. M. Fletcher, E. Ranieri, A. M. Das, U. Spiekerkotter, K. O. Schwab, S. Potzsch, I. Marquardt, J. B. Hennermann, I. Knerr, S. Mercimek-Mahmutoglu, N. Kohlschmidt, B. Liebl, R. Fingerhut, B. Olgemoller, A. C. Muntau, A. A. Roscher and W. Roschinger (2006). Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. *Hum Mutat*, 27(8): 748-59.

Stadler, S. C., R. Polanetz, S. Meier, P. U. Mayerhofer, J. M. Herrmann, K. Anslinger, A. A. Roscher, W. Roschinger and A. Holzinger (2005). Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(3): 939-46.

Stucki, M., T. Suormala, B. Fowler, D. Valle and M. R. Baumgartner (2009). Cryptic exon activation by disruption of an exon splice enhancer: A novel mechanism causing 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Biol Chem*.

- Sweetman L, W. J. (2001). Branched chain organic acidurias. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, McGraw-Hill. II: 2125-2163.
- Uematsu, M., O. Sakamoto, N. Sugawara, N. Kumagai, T. Morimoto, S. Yamaguchi, Y. Hasegawa, H. Kobayashi, K. Ihara, M. Yoshino, Y. Watanabe, T. Inokuchi, T. Yokoyama, K. Kiwaki, K. Nakamura, F. Endo, S. Tsuchiya and T. Ohura (2007). Novel mutations in five Japanese patients with 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Hum Genet*, 52(12): 1040-3.
- Vilarinho, L., H. Rocha, A. Marcao, C. Sousa, H. Fonseca, M. Bogas and R. Vaz Osório (2006). Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 37(5): 186-91.
- Visser, G., T. Suormala, G. P. Smit, D. J. Reijngoud, M. T. Bink-Boelkens, K. E. Niezen-Koning and E. R. Baumgartner (2000). 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father. *Eur J Pediatr*, 159(12): 901-4.
- Weatherall, D. J. (2008). The centenary of Garrod's Croonian lectures. *Clin Med*, 8(3): 309-11.
- Wen, J. and S. Brogna (2008). Nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 3): 514-6.
- Wiesmann, U. N., T. Suormala, J. Pfenninger and E. R. Baumgartner (1998). Partial 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with fatal outcome due to progressive respiratory failure. *Eur J Pediatr*, 157(3): 225-9.
- Wilcken, B., V. Wiley, J. Hammond and K. Carpenter (2003). Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med*, 348(23): 2304-12.
- Wolf, B. (2001). Disorders of Biotin Metabolism. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, McGraw-Hill. III: 3935-3962.
- Wolf, B. and G. L. Feldman (1982). The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am J Hum Genet*, 34(5): 699-716.
- Yap, S., A. A. Monavari, P. Thornton and E. Naughten (1998). Late-infantile 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as global developmental delay. *J Inherit Metab Dis*, 21(2): 175-6.



## **Anexos**

---



## 7. Anexos

### 7.1. Doenças integradas no rastreio alargado em 2009

O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce em Portugal iniciou-se em 1979 com o rastreio da PKU e em 1981 passou também a efectuar-se o rastreio do HC. Em 2004 foi iniciado o rastreio neonatal alargado por MS/MS, tendo sido progressivamente aumentado o numero de DHM rastreadas. As doenças integradas actualmente no rastreio alargado estão organizadas em dois grupos:

- Hipotiroidismo Congénito.
- Doenças Hereditárias do Metabolismo.

No grupo das doenças hereditárias do metabolismo são rastreadas Aminoacidopatias, Acidúrias Orgânicas e Doenças Hereditárias da  $\beta$ -oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos.

#### Aminoacidopatias:

- Fenilcetonúria (PKU)
- Hiperfenilalaninemias
- Tirosinemia Tipo I
- Tirosinemia Tipo II
- Leucinose (MSUD)
- Hipermetioninemia (Déf. MAT)
- Citrulinemia tipo I
- Acidúria Arginino-Succínica (ASA)
- Hiperargininemia
- Homocistinúria

#### Acidúrias Orgânicas:

- Acidúria Propiónica (PA)
- Acidúria Metilmalónica (MMA)
- Acidúria Isovalérica (IVA)
- Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica (3-HMG)

- Acidúria Glutárica Tipo I (GA I)
- 3-metilcrotonilglicinúria (Déf. 3-MCC)
- Acidúria Malónica

### Doenças Hereditárias da $\beta$ -oxidação Mitocondrial dos Ácidos Gordos:

- Défice da Desidrogenase dos Ácidos Gordos de Cadeia Média (MCAD)
- Défice da Desidrogenase dos Ácidos Gordos de Cadeia Muito Longa (VLCAD)
- Défice da Desidrogenase de 3-Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Longa (LCHAD)
- Défice Múltipla das Acil-CoA Desidrogenases dos Ácidos Gordos (Acidúria Glutárica Tipo II) (MADD)
- Défice em Carnitina-Palmitoil Transferase I (CPT I)
- Défice em Carnitina-Palmitoil Transferase II (CPT II)
- Défice Primária em Carnitina (CUD)

## **7.2. Preparação de amostras de sangue em papel (Guthrie cards) para análise de acilcarnitinas e aminoácidos**

Os metabolitos a analisar por MS/MS são extraídos do papel utilizando um solvente orgânico (metanol). Posteriormente são derivatizados, sendo-lhes adicionados grupos butilo, que vão facilitar a sua detecção. A detecção vai ser levada a cabo num espectrómetro de massa (triplo quadrupolo) API 2000 (*Applied Biosystems*), sendo as acilcarnitinas detectadas por Precursor Scan do ião 85.1; os aminoácidos por *Neutral Loss* do ião 102.1 e os aminoácidos básicos por MRM.

O doseamento é realizado em sangue total, disco de sangue de 3.2 mm que contém um volume aproximado de 3.23  $\mu$ l de sangue total, colhido em papel *Whatman* 903 e a amostra deve ser relativamente recente de forma a evitar a hidrólise das acilcarnitinas de baixo peso molecular.

### Preparação da amostra:

Cortar os círculos para os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços de fundo em V, utilizando para o efeito uma cortadora automática ou um alicate de corte.

Adicionar a cada um dos poços, utilizando um dispensador com reservatório, 100  $\mu$ l de solução diluída com os padrões marcados isotópicamente. Os padrões de acilcarnitinas e aminoácidos são retomados com 1 ml de metanol puro e deixa-se a 4°C durante 24 horas. Ao fim deste tempo junta-



se o conteúdo dos dois vials num terceiro. A solução diária de trabalho é obtida por diluição da anterior 1:100 em metanol puro.

Tapar a placa com uma folha de película aderente, para evitar a evaporação.

Eluir 25 minutos à temperatura ambiente, com agitação suave.

Transferir, com a ajuda de uma pipeta multicanal, o volume total para uma nova microplaca de fundo raso.

Evaporar totalmente.

Juntar, com uma pipeta multicanal e utilizando pontas com filtro, 60 µl de HCl em butanol 3N.

Tapar a placa com uma folha de película aderente.

Colocar na estufa 15 minutos a 70°C.

Colocar a -20°C durante 5 minutos.

Centrifugar 4 minutos a 500 rpm.

Evaporar a 70°C, totalmente.

Retomar com 100 µl de fase móvel. A fase móvel utilizada é composta por acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (50:50), com 0.05% de ácido fórmico. A preparação é feita directamente para o frasco onde vai ser utilizada.

Injecção no espectrómetro de massa.

### **7.3. Extracção de DNA a partir de sangue seco em papel de filtro (GENERATION® Capture Card Kit- Gentra Systems)**

#### **Procedimento**

##### Preparação da amostra:

Cortar discos com 3mm de diâmetro da amostra de sangue em papel, e colocar em tubos de 0,2ml ou 0,6ml ou em placas de 96 poços.

##### Purificação de DNA:

1. Adicionar 200 µL de Solução de purificação de DNA (Solução 1) ao tubo com o disco e incubar durante 15 minutos a 50 °C.
2. Pipetar a solução para cima e para baixo uma vez e depois descartar.
3. Repetir o passo 1 e 2 uma vez para um total de duas lavagens com a Solução de Purificação de DNA.

4. Ajustar a placa de aquecimento ou termociclador para 60 °C.
5. Adicionar 200 µL de Solução de eluição de DNA (Solução 2) aos discos e incubar durante 15 minutos a 60 °C.
6. Pipetar a solução para cima e para baixo uma vez, depois remover o máximo de solução possível. O DNA purificado ficará no disco.

#### Eluição do DNA:

1. Ajustar a placa de aquecimento ou termociclador para 99 °C.
2. Adicionar de 50 a 150 µL de Solução de eluição de DNA (Solução 2) (dependendo do volume e concentração de DNA pretendida) aos tubos ou placas de 96 que contem os discos purificados. Se as amostras estiverem em placas de 96 poços, cobrir a placa com uma película adesiva (e.g., *Gentra's Capture Heat Seals*) antes do aquecimento.
3. Incubar durante 15 minutos a 99°C, para que o DNA seja libertado.
4. Pipetar a solução 15 vezes para cima e para baixo para misturar e depois transferir o DNA eluído para novos tubos ou placas.
5. Armazenar o DNA a – 20 °C.

### **7.4. Regras de previsão do impacto de novas variações na estrutura e função das proteínas implementadas pelo programa *Polyphen***

**Tabela 13 - Regras de previsão do impacto de nsSNP's na estrutura e função proteica.**

Adaptado de <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.

	RULES (connected with logical AND)			PREDICTION	BASIS	EFFECT
	PSIC score difference:	Substitution site properties:	Substitution type properties:			
1	arbitrary	annotated as a functional site <sup>+</sup>	arbitrary	probably damaging	sequence annotation	functional, functional site (2.2)
2	arbitrary	annotated as a bond formation site <sup>++</sup>	arbitrary	probably damaging	sequence annotation	structural, bond formation (1.2)
3	arbitrary	in a region annotated as transmembrane	PHAT matrix difference resulting from substitution	possibly damaging	sequence annotation	functional, functional site, transmembrane (2.2.2)

4	arbitrary	in a region predicted as transmembrane	is negative	possibly damaging	sequence prediction	
5	$\leq 0.5$	arbitrary	arbitrary	benign	multiple alignment	
6	>1.0	atoms are closer than 3Å to atoms of a ligand	arbitrary	probably damaging	structure	functional, functional site, ligand binding (2.2.3)
7		atoms are closer than 3Å to atoms of a residue annotated as BINDING, ACT_SITE, or SITE	arbitrary	probably damaging	structure	functional, functional site, indirect (2.1)
8	in the interval (0.5..1.5]	with normed accessibility $\leq 15\%$	change of accessible surface propensity is $\geq 0.75$	possibly damaging	structure	structural, buried site, hydrophobicity disruption (1.1.1)
9			change of side chain volume is $\geq 60$	possibly damaging	structure	structural, buried site, overpacking (1.1.2)
10			change of side chain volume is $\leq -60$	possibly damaging	structure	structural, buried site, cavity creation (1.1.3)
11		with normed accessibility $\leq 5\%$	change of accessible surface propensity is $\geq 1.0$	probably damaging	structure	structural, buried site, hydrophobicity disruption (1.1.1)
12			change of side chain volume is $\geq 80$	probably damaging	structure	structural, buried site, overpacking (1.1.2)
13			change of side chain volume is $\leq -80$	probably damaging	structure	structural, buried site, cavity creation (1.1.3)
14	in the interval (1.5..2.0]	with normed accessibility $\leq 5\%$	change of accessible surface propensity is $\geq 1.0$	probably damaging	structure	structural, buried site, hydrophobicity disruption (1.1.1)
15			change of side chain volume is $\geq 80$	probably damaging	structure	structural, buried site, overpacking (1.1.2)
16			change of side chain volume is $\leq -80$	probably damaging	structure	structural, buried site, cavity creation (1.1.3)
17		arbitrary	arbitrary	possibly damaging	structure	structural, buried site, cavity creation (1.1.3)
18	>2.0	arbitrary	arbitrary	probably damaging	multiple alignment	

## 7.5. Resultados obtidos

Na tabela seguinte são apresentados todos os resultados, bioquímicos e moleculares, obtidos no estudo dos 20 casos seleccionados.

**Tabela 14- Resultados bioquímicos e moleculares obtidos nos 20 casos estudados**

Caso	Co	C5-OH	Confirmação Bioquímica	Efeito na Proteína	Gene
1	26,6	4	3- MCG; 3- HIVA	p.G130S/p.G130S	MCCA
2	20,6	1,5	3- MCG; 3- HIVA	p.E383K/N	MCCA
3	29,2	1,3	n.d.	p.Arg308_309SerfsX2/N	MCCA
4	77,4	2,3	n.d.	p.R385S/N	MCCA
5	16,9	14	3- MCG; 3- HIVA	p.Q34X/p.Q34X	MCCB
6	26,5	4,2	n.d.	p.N230D/N	MCCB
7	15,6	1,9	3- HIVA	p.R155W/ p.V339M	MCCB
8	27,2	1	3- HIVA	p.G68V/p.N230D	MCCB
9	8,45	13,2	n.d.	p.G410D/p.G410D	MCCB
10	16,1	4	3- HIVA	p.R155W/ p.G475R	MCCB
11	54,1	2,4	3- HIVA	p.V339M/ p.Ser546X	MCCB
12	n.d.	n.d.	3- MCG; 3- HIVA	p.G105R/ p. N163D	MCCB
13	28,9	5,5	3- HIVA	p.V339M/N	MCCB
14	31	3	n.d.	p.N230D/p.N230D	MCCB
15	12,6	1	3- HIVA	sem alterações	MCCB
16	13,9	1,2	n.d.	sem alterações	MCCB
17	23	3,7	3- HIVA	p.S173FfsX25/ p.V339M	MCCB
18	35	2,8	3- HIVA	p.V339M/p.F387V	MCCB
19	23,5	2,9	n.d.	p.I200N/ IVS 13+2T>C	MCCB
20	38,6	1,7	3- HIVA	p.V33G fsX6/N	MCCB